

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Гурова Наталия Алексеевна**

**«ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ - НОВЫЙ КЛАСС  
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ»**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
Академик РАН,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор  
Спасов Александр Алексеевич

**ВОЛГОГРАД – 2015**

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:.....	7
Введение.....	8
ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛА - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	17
1.1. НЕКАРДИОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА БЕНЗИМИДАЗОЛОВ .....	20
1.2. ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ.....	24
1.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	40
ГЛАВА 2. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ.....	43
2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.2. ОБОСНОВАНИЕ <i>IN SILICO</i> ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ.....	58
2.3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ .....	62
2.3.1. Подструктурный анализ влияния типа базовой структуры изучаемых соединений на уровень антиаритмической активности (данные ретроспективного и расширенного подструктурных анализов) .....	62
2.3.2. Оценка перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности .....	72
2.3.3. Подструктурный анализ влияния заместителей на уровень антиаритмической активности наиболее перспективных классов (данные расширенного подструктурного анализа).....	75
2.3.4. Конструирование целевого скаффолда высокоактивных веществ путем объединения ядра и высокозначимых заместителей .....	77
2.3.5. Влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи .....	80
2.3.6. Заключение .....	81
2.4. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ НАТРИЙ-ВОДОРОДНОГО ОБМЕННИКА 1-Й	

ИЗОФОРМЫ (NHE-1).....	82
2.4.1. Поиск ингибиторов NHE-1 в условиях <i>in vitro</i> среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов.....	82
2.4.2. Подструктурный анализ влияния типа базовой структуры изучаемых соединений на уровень NHE-1-ингибирующей активности.....	83
2.4.3. Определение перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности.....	86
2.4.4. Подструктурный анализ влияния заместителей на уровень NHE-1-ингибирующей активности N <sup>1</sup> -замещенных 2-аминобензимидазола .....	90
2.4.5. Конструирование скаффолда высокоактивных веществ путем объединения ядра и высокоактивных заместителей.....	91
2.4.6. Противоишемические свойства соединения РУ-1355 в условиях <i>in vivo</i> .....	92
2.4.6. Заключение .....	95
2.5. ПОИСК ИНОТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ.....	96
2.5.1. Изучение <i>in vitro</i> влияния веществ на активность фосфодиэстеразы кардиомиоцитов и сократимость изолированных предсердий .....	97
2.5.2. Анализ спектра экспериментальной кардиотонической активности вещества-лидера .....	99
2.5.3. Заключение .....	100
2.6. ПОСТРОЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО СКАФФОЛДА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА .....	100
2.6.1. Сравнительный анализ скаффолдов, ответственных за проявление антиаритмической, кардиотонической и противоишемической активностей и формирование парных скаффолдов .....	100
2.6.2. Конструирование интегрального скаффолда кардиопротекторной активности в ряду производных бензимидазолов .....	103
2.7. АНАЛИЗ СПЕКТРА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ <i>IN VITRO</i> .....	105

2.8. ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ФАРМАКОФОРНЫХ ФРАГМЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ .....	106
2.9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	108
ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С NHE-1-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ .....	112
3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	115
3.2. АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 .....	120
3.2.1. Антиаритмическое действие соединения РУ-1355 при длительной ишемии/реперфузии миокарда.....	120
3.2.2. Антифибрилляторный эффект соединения РУ-1355 на модели кратковременной ишемии/реперфузии миокарда.....	121
3.2.3. Влияние соединения РУ-1355 на порог электрических фибрилляций лабораторных животных .....	123
3.2.4. Действие соединения РУ-1355 на электрокардиограмму .....	125
3.2.5. Заключение .....	125
3.3. КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ.....	127
3.3.1. Сократительная активность соединения РУ-1355 .....	128
3.3.2. Влияние соединения РУ-1355 на уровень тропонина I в плазме крови и малонового диальдегида в миокарде.....	135
3.3.3.Эффект соединения РУ-1355 на морфологию миокарда .....	138
3.3.4. Заключение .....	143
3.4. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ- 1355 .....	145
3.4.1. Механизм антиаритмического действия соединения РУ-1355 .....	145
3.4.2. Механизм антиремоделирующего действия соединения РУ-1355.....	146
3.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	147
ГЛАВА 4. АНТИФИБРИЛЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	150
4.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	153

4.2. ЭФФЕКТ АМФЕДАЗОЛА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ..	157
4.3. ПРОТИВОФИБРИЛЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АМФЕДАЗОЛА .....	158
4.3.1. Эффективность амфедазола при предсердных и желудочковых фибрилляциях неишемического генеза .....	158
4.3.2. Активность амфедазола при постреперфузионных фибрилляциях.....	160
4.3.3. Влияние амфедазола на частоту навязанного ритма и порог электрических фибрилляций сердца лабораторных животных.....	161
4.4. ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АМФЕДАЗОЛА .....	162
4.6. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АМФЕДАЗОЛА .	164
4.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	165
ГЛАВА 5. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИФОСФОДИЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ .....	167
5.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	169
5.2. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-539 НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА В УСЛОВИЯХ НЕКОРОНАРОГЕННОГО НЕКРОЗА .....	171
5.3. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ- 539 .....	179
5.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	180
ГЛАВА 6. КАРДИАЛЬНЫЕ И НЕКОТОРЫЕ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗУЧАЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	181
6.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	182
6.2. ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И АМФЕДАЗОЛА.....	185
6.3. КАРДИОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ РУ-1355 И АМФЕДАЗОЛА.....	189
6.3.1. Изучение кардиотоксических свойств соединения РУ-1355.....	189
6.3.2. Оценка кардиотоксических свойств амфедазола.....	190
6.3.3. Кардиотоксические эффекты соединения РУ-539.....	193
6.4. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ.....	193

6.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	195
7. ОБСУЖДЕНИЕ .....	196
ВЫВОДЫ: .....	226
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	229
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	230
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	278

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:**

NHE-1 - натрий/водородный обменник 1 изоформы

PKA - протеинкиназа A

QSAR - Quantitative Structure-Activity Relationship

БИ - бензимидазолы

ИЗО, ISO – изопротеренол

ИмБИ - имидазобензимидазолы

ИТ – информационные технологии

ЛЖД - левожелудочковое давление

ЛКА – левая коронарная артерия

МДА - малоновый диальдегид

МИФС - максимальная интенсивность функционирования структур

МЭК - минимальная эффективная концентрация

ПОЛ - перекисное окисление липидов

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

СЭ - синий Эванс (краситель)

Тн I - тропонин I

ТФТ - 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид

ФДЭ - фосфодиэстераза

ХСН - хроническая сердечная недостаточность

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭКГ - электрокардиограмма

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются значимой медико-социальной проблемой, поскольку занимают первое место в структуре заболеваемости и смертности [Баланова, 2013; Шальнова, 2013; Шляхто, 2013; Tamargo, 2009; Janssens, 2012; Liu, 2013; Thihalolipavan, 2014]. Среди летальных случаев в Российской Федерации на долю ишемической болезни сердца приходится 25,7%, инсультов - 21,4% [Моисеев, 2012; Оганов, 2012; Скворцова, 2013; Бойцов, 2014].

В основных положениях Постановления президиума РАМН «Развитие научных исследований и научной инфраструктуры в рамках задач платформы "Сердечно-сосудистые заболевания"» особо отмечается необходимость современных инноваций при лечении острых коронарных катастроф, а также "...важность дальнейших фундаментальных исследований, направленных на **создание новых лекарственных средств, модулирующих эндогенный потенциал органов сердечно-сосудистой системы**" [Дедов, 2012; Чазов, 2012; Шляхто, 2012]. Таким образом, усилилось внимание к поиску новых кардиопротекторных препаратов, а глобальной задачей лечения ССЗ является улучшение прогноза заболевания, предупреждение развития осложнений, увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества [Шляхто, 2005; Симоненко, 2011; Моисеев, 2012]. Особое значение для современной фармакотерапии имеет влияние кардиотропных препаратов на процессы торможения ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования [Арутюнов, 2002; Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010]. Поэтому поиск, изучение и создание новых кардиопротекторных средств является актуальной задачей в решении проблемы улучшения прогноза ССЗ.

Известно, что производные бензимидазолов обладают кардиотропной активностью [Спасов, 1999; Анисимова, 2002-2012; Bansal, 2012; Barot, 2013; Jain, 2013; Shah, 2013; Keri, 2014]. Среди них найдены соединения, тормозящие процессы ремоделирования миокарда и относящиеся к ингибиторам натрий-водородного обменника (NHE) [Zhang, 2007]; проявляющие признаки высокого сродства к ионным каналам [Анисимова, 2009; Галенко-Ярошевский, 2009, 2015; Поротиков, 2008], известны антиаритмические (афобазол и



ритмидазол) [Кириллов, 1996; Шабашева, 1997; Спасов, 1999; Петров, 2003; Цорин, 2009; Крыжановский, 2012, 2013; Середенин, 2013] и инотропные (пимобендан и адибендан) [Gordon, 2006; Endoh, 2008; Rao, 2009; Boswood, 2010] препараты. Найдены противоишемические вещества, способные стабилизировать работу сердца в условиях гипоксии и снижать агрегацию тромбоцитов [Спасов, 1984; Панченко, 1990; Чернов, 1990]. Поэтому поиск потенциальных кардиопротекторных средств среди производных бензимидазола является целесообразным.

### **Степень научной разработанности проблемы.**

Известно о значительном влиянии ремоделирования сердца на становление, развитие и прогрессирование ССЗ и их осложнений, в том числе смертности. Так, фиброз миокарда (морфологическое ремоделирование) у больных с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью является аритмогенным фактором. Стойкая желудочковая тахикардия (ионное и электрофизиологическое ремоделирование) вызывает нарушение гемодинамики и способствует морфологическому ремоделированию сердца [Колбин, 2010; Шаваров, 2011; Моисеев, 2012].

В настоящее время хорошо описаны патофизиологические механизмы данного процесса на системном, органном, молекулярном уровнях, определены возможные мишени (ионные каналы, ферменты, обменники ионов и другие факторы, нарушения со стороны которых приводят к ремоделированию структур миокарда) для воздействия лекарственных препаратов. Так, роль 1 изоформы натрий-водородного обменника связана с участием в развитии «кальциевого парадокса», а ФДЭ кардиомиоцитов - с влиянием на цитоскелет и сократительные волокна.

Однако следует отметить недостаточную степень фармакологической разработанности данного направления. Не полностью изучены свойства известных лекарственных препаратов вызывать регрессию гипертрофии сердца, нормализацию геометрии камер сердца и восстановление электрофизиологической гомогенности миокарда [Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010]. Ведется поиск соединений, тормозящих процессы ремоделирования и вызывающих его обратное развитие. Используемые в России кардиопротекторы (триметазидин, этилметилгидроксипиридина

сукцинат, милдронат) относятся к «метаболическим» и имеют недостаточно высокую клиническую эффективность [Петров, 2012; Мареев, 2013].

Известные свойства производных бензимидазола влиять на такие клеточные мишени, как трансмембранные ионные токи и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник, активность ФДЭ, подтверждают целесообразность проведения направленного поиска кардиопротекторов среди соединений данного класса с последующим экспериментальным изучением их фармакологического потенциала.

**Целью** настоящего исследования является проведение направленного поиска веществ, оказывающих кардиопротекторное действие, среди новых производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, обладающих NHE-ингибирующими, антифосфодиэстеразными свойствами и блокирующих трансмембранные ионные токи.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие **задачи**:

1. Осуществить консенсусный прогноз наличия кардиопротекторных свойств у конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола с использованием иерархической системы целенаправленного поиска *in silico*.

2. Провести поиск соединений, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс, среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов и определить эффекты наиболее активного вещества на трансмембранные ионные токи *in vitro*.

3. Изучить влияние производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на активность натрий/водородного обменника (NHE-1) *in vitro* с последующей оценкой противоишемических свойств соединения-лидера *in vivo*.

4. Выполнить оценку данных об уровне антифосфодиэстеразного действия производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов и изучить влияние на сократительную активность изолированных предсердий крыс *in vitro* у эффективных представителей данного класса для выбора перспективного вещества.

5. Провести анализ *in silico* влияния базовой структуры бензимидазола и заместителей на уровни изучаемых фармакологических видов активностей.

6. Исследовать кардиопротекторные (антиремоделирующие) эффекты и механизм

действия наиболее активного среди ингибиторов NHE-1 соединения РУ-1355 при коронарогенном и некоронарогенном повреждении миокарда.

7. Определить антиремоделлирующие свойства амфедазола, наиболее активно увеличивающего продолжительность рефрактерного периода изолированных предсердий крыс.

8. Оценить кардиопротекторное действие наиболее активного в отношении сократимости изолированных предсердий крыс соединения РУ-539 среди ингибиторов ФДЭ при некоронарогенном повреждении миокарда.

9. Изучить кардиальные и некоторые экстракардиальные побочные эффекты соединений-лидеров.

### **Научная новизна.**

Впервые проведен консенсусный прогноз перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (1393 структур) как источников веществ с кардиопротекторной активностью: в системе PASS для 19 видов биологической активности, релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию, и с помощью ИТ «Микрокосм» методом сходства к эталонам.

Впервые создана иерархическая система целенаправленного поиска *in silico* новых кардиопротекторных соединений с заданным механизмом действия среди производных привилегированной подструктуры бензимидазола – эффективных противоишемических, антиаритмических и кардиотонических корректоров; проведен многоэтапный итеративный виртуальный и экспериментальный скрининг этих соединений на различных моделях *in vitro* и *in vivo*. *In silico* найдены значимые признаки высокого уровня противоишемической и антиаритмической активностей для различных классов новых замещенных и незамещенных производных бензимидазола.

Впервые были получены данные о противоишемическом, антифибрилляторном и антигипертрофическом эффектах соединения РУ-1355 на моделях коронарогенного и некоронарогенного повреждения миокарда в сравнении с ингибитором NHE зонипоридом. Проведено сравнительное изучение антиремоделлирующей активности амфедазола и препарата сравнения амиодарона, в том числе в условиях ишемии миокарда. Изучены инотропные и кардиопротекторные свойства ингибитора ФДЭ соединения РУ-539 на

модели экспериментальной хронической сердечной недостаточности.

Изучены кардиальные и экстракардиальные побочные эффекты, а также острая токсичность высокоактивных соединений РУ-1355, амфедазола, РУ-539. Описаны клинические признаки интоксикации данными веществами.

### **Научно-практическая значимость.**

В результате экспериментального поиска среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола новых веществ, ингибирующих NHE-1, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс и сократительную активность изолированных предсердий крыс у соединений с антифосфодиэстеразной активностью, была сформирована база данных соединений, изученных на предмет описанных видов активности.

Выявленные *in silico* значимые признаки высокого уровня NHE-ингибирующего и антифибрилляторного эффектов используются для направленного синтеза и поиска новых высокоактивных соединений.

Результаты расширенных фармакологических исследований *in vivo* соединения РУ-1355 с выраженной NHE-ингибирующей активностью, показавшего выраженные противоишемические и антиремоделирующие свойства; амфедазола, проявляющего свойства антиаритмического вещества III класса и демонстрирующего в ходе исследований выраженные антифибрилляторные и антиремоделирующие эффекты; соединения РУ-539 с антифосфодиэстеразной активностью, повышающего сократительную активность и функциональные резервы миокарда, свидетельствуют о необходимости проведения расширенных доклинических исследований.

### **Методология и методы исследования.**

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Арзамасцев, 2012; Галенко Ярошевский, 2012; Тюренков, 2012; Чичканов, 2012], также с использованием современных высокоинформативных методов, имеющихся в ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ (ВолГМУ), НИИ фармакологии ВолГМУ и ГБУ "Волгоградский медицинский научный центр" (ГБУ ВМНЦ).

Эксперименты проведены на нелинейных половозрелых мышах, крысах, а также

кроликах-самцах породы «Шиншилла».

Исходя из поставленных цели и задач исследования, были использованы современные методы *in silico* (системы PASS и ИТ Микрокосм, статистические методы теории распознавания образов), позволяющие с высокой степенью достоверности провести прогноз и выявить значимые признаки высокого уровня противоишемической и антиаритмической активностей. Выбранные экспериментальные модели коронарогенного и некоронарогенного повреждения миокарда и определяемые показатели позволили изучить влияние соединений на ионное, электрофизиологическое, гемодинамическое и морфологическое ремоделирование.

### **Реализация результатов исследования.**

Данные об антиаритмическом, NHE-ингибирующем и инотропном эффектах соединений, анализ влияния типа базовой структуры и заместителей на уровни активности в перспективных классах конденсированных и неконденсированных бензимидазолов используется при синтезе новых соединений в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Предложенная иерархическая система целенаправленного поиска *in silico* новых кардиопротекторных соединений используется в работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, кафедры фармакологии, кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, Волгоградского медицинского научного центра.

По результатам исследований соединений РУ-1355 и РУ-539 подготовлены и представлены заявки на формирование тематики работ в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по мероприятию «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств».

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедр фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедр фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, Воронежской государственной

медицинской академии имени Н.Н. Бурденко, Белгородского государственного национального исследовательского университета.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее перспективными для поиска новых кардиотропных соединений являются следующие дериваты бензимидазола: - веществ с антиаритмической активностью среди производных N<sup>9</sup>-ИМБИ и N<sup>1</sup>-ИМБИ, содержащие в положении R<sub>2</sub> - фенильный и в положении R<sub>3</sub> - диэтиламиноэтильный заместители; - соединений с NHE-ингибирующей активностью в группе N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола, содержащие в положениях N<sup>1</sup> морфолиноэтильный значимый заместитель.

2. Соединение - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид - под лабораторным шифром РУ-1355 активно ингибирует NHE тромбоцитов кролика *in vitro* (IC<sub>50</sub>=5,42x10<sup>-10</sup> М) и значительно превосходит зонипорид (IC<sub>50</sub>=2,7x10<sup>-8</sup> М). Вещество РУ-1355 замедляет ионное, гемодинамическое и морфологическое ремоделирование миокарда: статистически достоверно в 1,8 раза уменьшает размер зоны некроза миокарда, ограничивает рост тропонина I в плазме крови в 2,5 раза; снижает тяжесть постреперфузионных нарушений ритма (p<0,05); увеличивает порог электрических фибрилляций по сравнению с эффектами у животных контрольной группы; ограничивает повреждение миокарда и улучшает его сократимость у животных с изопротереноловой ХСН.

3. Соединение - 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – амфедазол интенсивно влияет на рефрактерность изолированных предсердий (МЭК=1,60x10<sup>-5</sup>М) и превосходит амиодарон по величине МЭК в 10 раз. Оно блокирует трансмембранные ионные токи: в дозе 5\*10<sup>-5</sup>М калиевый ток уменьшился на 60%, токи натрия и кальция - на 34% каждый. Амфедазол препятствует электрофизиологическому ремоделированию миокарда: на моделях фибрилляций ишемического и неишемического генеза превосходит препарат сравнения амиодарон по величине ЕД<sub>50</sub> в 9 раз и более; увеличивает порог электрических фибрилляций желудочков, по снижению тяжести ишемического повреждения превосходит амиодарон в 1,5 раза.

4. Соединение - 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия бромид - под лабораторным шифром РУ-539 в концентрации 1\*10<sup>-4</sup>М снижает активность

ФДЭ кардиомиоцитов кролика на 66,7%; увеличивает сократимость изолированных предсердий ( $IC_{50}=4,2 \times 10^{-7} M$ ) и превосходит амринон в 6 раз. Соединение РУ-539 ограничивает гемодинамическое ремоделирование миокарда: на модели некоронарогенного некроза миокарда *in vivo*: повышает сократительную активность и функциональные резервы сердца.

5. Величина  $LD_{50}$  исследуемых производных бензимидазола составляет для соединений: РУ-1355 - 342,7 мг/кг, амфедазола - 60,0 мг/кг, РУ-539 - 118 мг/кг, то есть они являются умеренно токсичными.

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на нелинейных половозрелых мышах (174) и крысах (860) обоего пола, 60 кошках обоего пола, 15 кроликах-самцах породы «Шиншилла»; с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования и специфических маркеров в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению противоишемического (антиангинального) действия [Чичканов, 2012], кардиотонической активности лекарственных средств [Тюренков, 2012], антиаритмических лекарственных средств [Галенко-Ярошевский, 2012], а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на IV Международном славянском конгрессе по электростимуляции и клинической электрофизиологии сердца, Санкт-Петербург, 2000 г.; IV, V Международных научно-практических конференциях "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: материалы", Ростов-на-Дону, 2011, 2012 гг.; Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина «Современные проблемы химической науки и фармации» Чебоксары, 2014; V Всероссийском научно-практическом семинаре «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств», Волгоград, 2013 г.; XVII, XVIII, XIX, XIX Российских национальных конгрессах «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО», Москва, 2009, 2010, 2011, 2012 гг.; III съезде фармакологов России «Фармакология – практическому здравоохранению», Санкт-

Петербург, 2007; IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 2012 г.; Первой Российской конференции по медицинской химии (Med Chem Russia-2013) с международным участием, Москва, 2013 г.; Втором международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» Москва, 2010 г.; 5-th International Symposium "Methods and Applications of Computational Chemistry", Kharkiv, Ukraine, 2013; 20<sup>th</sup> EuroQSAR Understanding Chemical-Biological Interactions St-Peterburg, 2014; Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 2014.

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 47 печатных работ, в том числе 19 статей, из которых 16 - статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получено 6 патентов на изобретения.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста, иллюстрирована 40 таблицами, 34 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VI), обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и приложений. Список литературы включает 208 отечественных и 272 иностранных источника.

### **Личный вклад автора.**

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме.

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах решения поставленных задач: при проведении экспериментального скрининга антифибрилляторной, NHE-ингибирующей и кардиотонической активности конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, исследований *in silico*, изучении *in vitro* и *in vivo* фармакологической и токсикологической активности соединений-лидеров, статистической обработке, обсуждении результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций, оформлении рукописи.



## ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛА - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Последние годы при поиске биологически активных веществ развивается концепция "привилегированных структур или подструктур". Использование этих молекул должно позволить исследователям более эффективно искать перспективные соединения для последующего изучения в качестве потенциальных лекарственных средств [Horton, 2003; DeSimone, 2004; Kamal, 2006; Han, 2011; Kim, 2014; Szabo, 2014].

Термин "привилегированные структуры" впервые ввел Эванс и др. в 1988 году и определил как базовые структуры ("кор"<sup>1</sup>) с универсальными связывающими свойствами, когда один "кор" способен обеспечить эффективные и высокоселективные лиганды для целого ряда различных биологических мишеней за счет модификации функциональных групп [Kamal, 2006; Verma, 2013]. В качестве привилегированных подструктур в литературе описаны такие, как фенилзамещенные моноциклы (бифенилы, арилпиперидины, арилпиперазины, 1,4-дигидропиперидины, дигидропиримидоны и др.), и гетероциклические системы (пурины, бензодиазепины, бензопираны, кумарины и пиранокумарины, хиноксалины, хиназолины, индолы, бензимидазолы, бензофураны, бензотиофены и др.) [Horton, 2003; DeSimone, 2004; Zorniak, 2011; Lal, 2012; Polanski, 2012; Ibrar, 2013; Verma, 2013; Kaur, 2014; Kim, 2014; Song, 2014].

В настоящее время создание лекарственного препарата первоначально связано с поиском активного соединения – структурного прототипа - и дальнейшей его оптимизацией, заключающейся в синтетической модификации структуры соединения-лидера с целью повышения его известной активности, улучшения фармакокинетических характеристик, уменьшения токсичности и увеличения селективности действия. Подходы, используемые на этапе оптимизации "родительского прототипа", включают в себя синтез структурных аналогов или биоизостерическую<sup>2</sup> замену [Зефирова, 2002, Ahmad1, 2004; Keri, 2014].

Ядро бензимидазола является "привилегированной подструктурой" и имеет большое

---

<sup>1</sup> Кор (ядро) (медицинская химия) - это достаточно общая базовая структура.

<sup>2</sup> Биоизостером называется соединение, получающееся путем замены одного атома (группы атомов) на другой атом (группу атомов), сохраняющее биологическую активность исходного соединения [Зефирова, 2002].

значение для медицинской химии [Horton, 2003; DeSimone, 2004; Kamal, 2006; Verma, 2013]. Оно входит в состав многих биологически активных гетероциклических соединений, для него определен широкий спектр фармакологических активностей, таких как противомикробная, противовирусная, противопаразитарная, противоопухолевая, противовоспалительная, антиоксидантная, гипотензивная, антикоагулянтная, иммуномодулирующая. Среди них найдены гормональные модуляторы, стимуляторы и депрессанты ЦНС, ингибиторы протонного насоса, модуляторы уровня липидов, противодиабетические соединения и т.д. [Bansal, 2012; Narasimhan, 2012; Barot, 2013; Jain, 2013; Shah2, 2013; Gaba, 2014; Keri, 2014]. Оптимизация заместителей вокруг ядра бензимидазола привело к созданию лекарственных препаратов: антигельминтных - альбендазол, мебендазол, тиабендазол; противоязвенных ингибиторов протонного насоса - омепразол, лансопразол, пантопразол; антигистаминных - астемизол; противовирусных - энвираден; гипотензивных - кадесартана цилекситил и телмисартан и др. На рисунке 1.1 представлены некоторые лекарственные и ветеринарные препараты - производные бензимидазола.

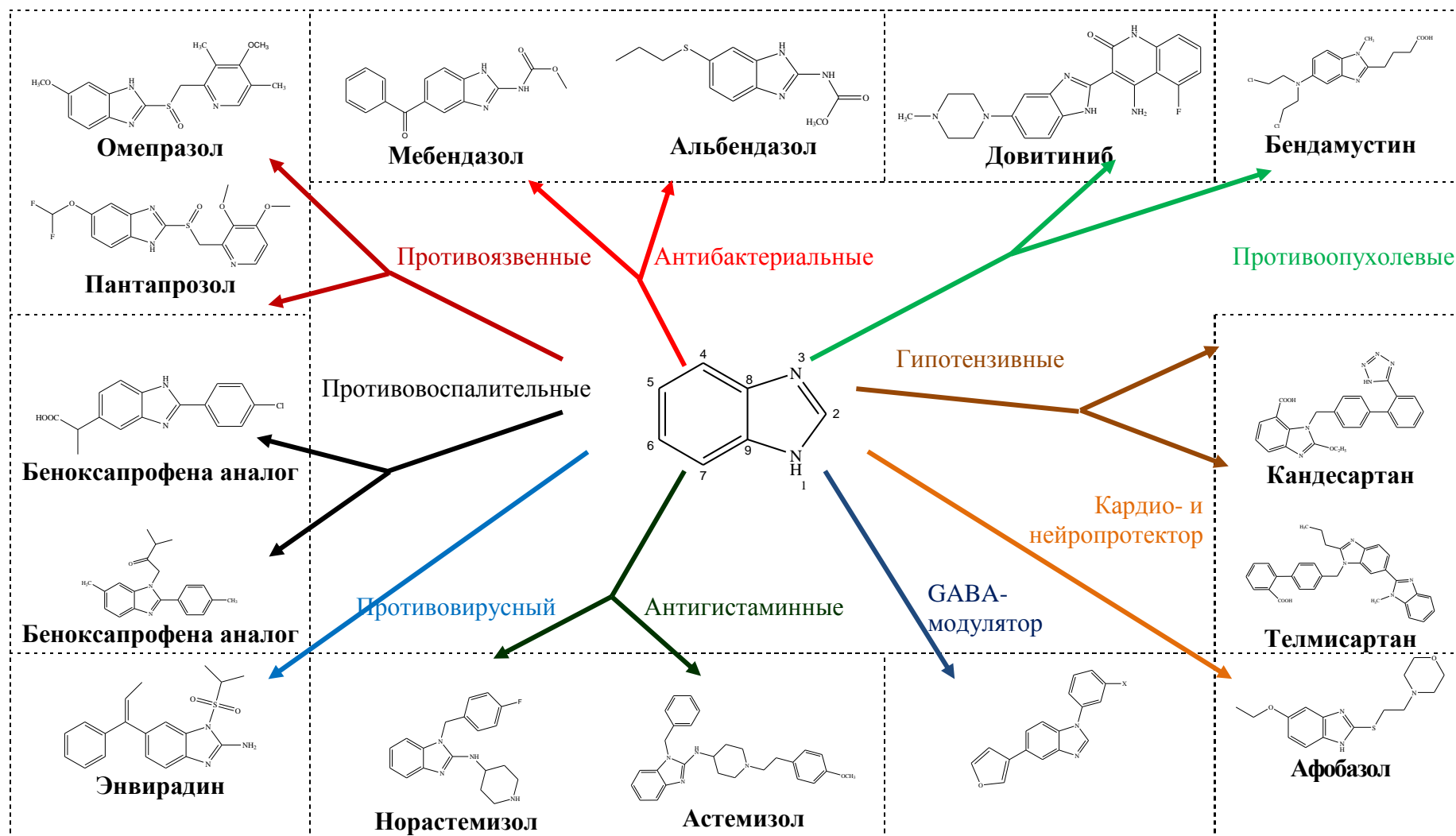
Кроме того, производные бензимидазола являются структурными "неклассическими" биоизостерами<sup>1</sup> природных нуклеотидов, то есть имеют похожие гидрофобные, электронные и стерические характеристики, что позволяет им легко взаимодействовать с биополимерами в живой системе [Зефирова, 2002; Narasimhan, 2012; Keri, 2014].

Наличие ядра бензимидазола в многочисленных категориях терапевтических агентов сделало его незаменимой базовой структурой для создания новых лекарственных средств. Разнообразные заместители вокруг ядра бензимидазола определяют широкий спектр биологических эффектов и позволяют моделировать фармакологическую активность методами QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship).

Впервые о терапевтическом потенциале бензимидазола (БИ) заговорили в 1944 году, когда Woolley предположил, что БИ оказывают эффект подобно пуринам. В 1950-х годах Brink было установлено, что 5,6-диметил-1-(AD-рибофуранозил) бензимидазол является неотъемлемой частью структуры витамина B<sub>12</sub> [Спасов, 1999; Narasimhan, 2012].

---

<sup>1</sup> Неклассические биоизостеры - атомы или группы, не обладающие характеристиками классических изостеров (приблизительно одинаковый размер, форма и конфигурация внешнего электронного слоя), однако имеющие сходную биологическую активность.



**Рис. 1.1. Некоторые лекарственные и ветеринарные препараты производные бензимидазола**  
(адаптировано [Velik, 2004; Bansal, 2012]).

В результате этого открытия и обширных исследований было установлено, что бензимидазол эффективен при лечении паразитарных заболеваний. Публикации результатов дали толчок изучению БИ как ядра биологически активных соединений. На протяжении многолетних исследований бензимидазольное кольцо превратилось в привилегированную подструктуру среди азотсодержащих гетероциклических систем.

Впервые бензимидазол (2,5 или 2,6-диметилбензимидазола) был получен в 1872 году Ноебрекер за счет редукции 2-нитро-4-метилацетанилида. Несколько лет спустя Ladenburg получил те же самые соединения при кипячении 3,4-диаминотолуола с уксусной кислотой. Бензимидазолы были также известны как "бензимидазолы" и "бензоглиоксалины" [Bansal, 2012].

Считается, что хотя во все семь положений ядра БИ можно ввести химические заместители, однако, большинство из биологически активных соединений имеют функциональные группы в положении N<sup>1</sup>, C<sup>2</sup> и/или C<sup>5</sup> (или C<sup>6</sup>). Соответственно, соединения могут быть моно-, ди- или три-замещенными производными.

## 1.1. НЕКАРДИОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА БЕНЗИМИДАЗОЛОВ

### *Противогельминтные, противомикробные, противовирусные и противоопухолевые свойства*

Первоначально было установлено, что бензимидазол эффективен при лечении паразитарных заболеваний. Открытие тиабендазола в 1951 году в дальнейшем стимулировало химиков всего мира на синтез тысяч бензимидазолов в качестве глистогонных средств [Kazimierczuk, 2002; Alonso, 2009; Padilla, 2009; Mavrova, 2010].

В настоящее время известны такие **противоглистные** лекарственные и ветеринарные препараты как карбендазим, альбендазол, фенбендазол, мебендазол, тиабендазол, карбендазол и флубендазол.

У производных бензимидазола выявлена **антибактериальная** активность в отношении Грам<sup>+</sup> и Грам<sup>-</sup> бактерий [Ansari, 2009a, 2009b, 2009c; Chhonker, 2009; Eisa, 2010; Gupta, 2010; Rajanarendra, 2010; Cong, 2011; Selvam, 2011]; противотуберкулезное [Gill, 2008; Shingalapur, 2009] и противогрибковое действие [Varsha, 2004; Kilcigil, 2006;

Venkataramana, 2009; Amrutkar, 2010; Sheng, 2011; Singh3, 2011]. Антимикробным действием обладают некоторые имидазобензимидазолы (ИмБИ) [Анисимова, 2002а, 2002б, 2011].

Многочисленные аналоги бензимидазола были синтезированы в 1950-1990-х годах в качестве селективных **противовирусных** средств. К нуклеозидным аналогам, пришедшим к клиническому применению в начале 1980-х как мощные ингибиторы широкого спектра РНК вирусов, относятся энвирадин и энвироксим [Bansal, 2012].

Производные бензимидазола активны в отношении ВИЧ: найдены соединения, использующиеся в качестве антагонистов хемокиновых рецепторов CXCR4 [Miller, 2010], CXCR3 [Hayes, 2008], CCR5 [Tallant, 2011]. Выявлены вещества, эффективные в отношении энтеровирусов (вирусы Коксаки А16, В3, В6 и энтеровирус 71 VERO cells) [Xue, 2011], активные при гепатите С [Hwu, 2008], гепатите В [Bansal, 2012].

Бензимидазолы оказывают цитотоксическую (**противоопухолевую**) активность [Kamal, 2008; Abbs Fen Рэй, 2009; Dettmann, 2010; Galal, 2010; Tanged, 2010; Luo2, 2011; Noolvi, 2011; Demirayak, 2011].

**Влияние бензимидазолов на обмен веществ, гормональную регуляцию, иммунотропные, противовоспалительные и анальгетические свойства**

Нарушения метаболизма жиров, белков и углеводов, гормональный дисбаланс приводят к развитию различных осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы (ангиопатии, эндотелиальная дисфункция, миокардиодистрофии и кардиомиопатии и др.). Известно участие активных форм кислорода, медиаторов и клеток воспаления и иммунного ответа в патогенезе развития ишемического повреждения сердца и миокарда. Поэтому для последующей оценки кардиотропной активности представляет интерес влияния БИ на процессы обмена.

Современные достижения в понимании этиологии и патогенеза сахарного диабета позволили выявить новые мишени для поиска пероральных антидиабетических соединений. Ряд производных бензимидазола обладают свойствами активаторов глюкокиназы [Ishikawa, 2009], ингибиторов фруктозо-1,6-бисфосфатазы [Dang, 2010], модуляторов рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR $\gamma$ ) [Liu2, 2011], ингибиторов SGLT2 (натрий-глюкозный котранспортер реабсорбции глюкозы в почках),

антагонистов GCGR (рецепторов глюкагона в печени) [Barot, 2013], ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) [Vinodkumar, 2008]. Среди производных ИмБИ также выявлена высокая гипогликемическая активность. Наиболее выраженный эффект показало соединение РУ-254 (диабенол) [Спасов, 1997, 2013д].

Регуляции липидного уровня является важной стратегией в лечении сердечно-сосудистых и других заболеваний. Среди производных бензимидазола найдены соединения, действующие избирательно на стероил коэнзим-А десатуразу человека 1 изоформы (hSCD1), агонисты LXR-рецепторов (X рецепторы печени (LXR - liver X receptors) и агонисты FXR-рецепторов (фарнезолиндуцируемые X рецепторы (FXR), ингибиторы нейропептида Y (NPY), антагонисты мелатониновых рецепторов подтипа 1 (MCH R<sub>1</sub>) и подтипа 4 (MCH R<sub>4</sub>) [Bansal, 2012].

У производных бензимидазола обнаружены свойства антагонистов рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона, гонадотропин-рилизинг-гормона, рецепторам прогестерона, глюкокортикоидов и андрогенов, андрогенных рецепторов в простате, ингибиторов ген-кальцитонинового пептида (CGRP) [Ng, 2007; Barot, 2013]. Имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы способны блокировать рецепторы 1 типа кортикотропин-рилизинг фактора [Han, 2005].

При оценке **иммунотропных, противовоспалительных и анальгетических свойств**, учитывая возможный механизм действия, среди производных БИ найдены соединения с активностью в отношении следующих мишеней: лимфоцитспецифичных киназ (Lck), интерлейкинрецепторсвязанной киназы 4 (IRAK-4), Janus киназ (JAK1-JAK3 и Tyk2), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), серин треонин киназы (IKK-3), хемокинов (CXCL10), анти-IgE, циклооксигеназы (ЦОГ-2), циклинзависимых киназ (CDK1 и CDK5), интерлейкина IL-1b, митогенактивированной протеинкиназы (p38a MAP киназы) [Bansal, 2012] канабиноидных, брадикининовых, ванилоидных (TRPV1) рецепторов, 5-липооксигеназы [Gaba, 2014]. В исследованиях *in vivo* показаны обезболивающий и противовоспалительный эффекты производных бензимидазола [Leonardo, 2006; Mohamed, 2006; Achar, 2010; Anandarajagopal, 2010a, 2010b; Babu, 2010; Gaba, 2010, 2014; Reddy, 2010; Shanmugapandiyan, 2010; Mariappan, 2011]. Ряд соединений, активных в отношении киназ, в настоящее время проходят клинические испытания при аутоимунных и воспалительных заболеваниях [Bansal, 2012].

### **Нейро- и психотропная активности**

Среди производных бензимидазола выявлены соединения с **противосудорожной** активностью [Anandarajagopal, 2010a, 2010b; Jha, 2010; Siddiqui, 2010; Singh2, 2010; Shingalapur, 2010; Shaharyar, 2012]. Производные имидазобензимидазолов обладают **местноанестезирующей и противосудорожной** активностями [Галенко-Ярошевский, 2009, 2015; Лисицына, 2009а, 2009б; Калитин, 2012; Киселев, 2013].

Среди производных БИ найдены антагонисты  $H_3$  [Mor, 2004; Rivara, 2006; Aslanian, 2008] и  $H_1$  гистаминовых рецепторов в ЦНС [Con, 2009; Erb, 2010]; соединения, обладающие сродством к серотонинергическим  $5-HT_{1A}$  и  $5-HT_3$  рецепторам, селективностью к  $\alpha_1$ -адрено- и дофаминовым  $D_2$  [Lopez-Rodriguez, 2004],  $5-HT_{2A/D2}$  рецепторам [Tomis, 2007; Andric, 2008]; ингибирующие обратный захват норэпинефрина [Zhang, 2008]. Психоактивные свойства связаны также с агонистическим действием в отношении ГАМК [Jordan, 2002; Shaffer, 2007], бензодиазепиновых и  $\alpha_1$ -адренорецепторам [Falco, 2006], антагонизмом с NMDA-рецепторами [Kohara, 2005; Borza, 2006]. Известны производные бензимидазола со свойствами агонистов и антагонистов опиоидных  $\delta$  и агонистов  $\mu$  рецепторов [Balboni, 2005; Ballet, 2006; Gaba, 2014].

В НИИ фармакологии РАМН им. В.В. Закусова разработан оригинальный селективный анксиолитический препарат афобазол (5-этоксид-2-[2-(морфолино)-этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид). Соединение оказывает влияние на  $\sigma_1$ , мелатониновые рецепторы  $MT_1$  и  $MT_3$  типа и регуляторный участок MAO-A. Основной механизм действия афобазола связан с  $\sigma_1$  рецепторами, которые оказывают модулирующее влияние на все основные нейромедиаторные системы, такие как ГАМКергическая, серотонинергическая, норадренергическая, дофаминергическая, холинергическая системы, и NMDA-зависимые глутаматные эффекты, играющие значимую роль в патогенезе тревоги, депрессии, нарушений памяти и нейродегенеративных заболеваний. Афобазол не связывается напрямую с ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепиновым рецепторным комплексом. Механизм его анксиолитического действия основан на способности предотвращать стресс-индуцированное снижение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК-A рецептора и восстанавливать чувствительность ГАМК-A рецептора к действию ГАМК. Кроме анксиолитического действия афобазол обладает антидепрессивным: устраняет тревогу,

эмоциональное напряжение, улучшает настроение и сон, не вызывает характерных для традиционных транквилизаторов агонистов бензодиазепиновых рецепторов таких побочных эффектов как гипноседативный, миорелаксирующий и анамнестический [Турилова, 2010; Разумная, 2012, 2014; Середенин, 2009, 2013].

Исследования фармакологических эффектов производных ИмБИ, проводимые в течении ряда лет в Волгоградском государственном медицинском университете позволили выявить Н<sub>1</sub>-антагонистическую, Н<sub>3</sub>-агонистическую, 5-НТ<sub>2</sub>-антагонистическую, 5-НТ<sub>3</sub>-антагонистическую [Спасов, 2006а, 2007, 2013а, 2013б; Черников, 2013а, 2013б]; каппа-агонистическую активности [Анисимова, 2009; Спасов, 2013в; Патент РФ RU 2413512, Гречко, 2014].

## **1.2. ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ**

Разработка современных методов лечения и инновационных мишеней для создания новых лекарственных препаратов обозначен приоритетной задачей. Необходимо определить перспективность поиска средств, влияющих на сердечно-сосудистую систему, среди производных БИ.

### **Влияние на реологические свойства и систему гемостаза**

Влияние различных патогенных факторов на основные реологические компоненты, определяющие текучесть крови в микрососудах, приводят к изменениям тех или иных элементов структуры кровотока. Реологически активные средства снижают вероятность развитие ишемических осложнений основного заболевания. В исследованиях Наumenко [2012а, 2012б] было показано, что наиболее перспективными по гемореологическому действию *in vitro* и *in vivo* являются производные N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола, 2,3-дигидро-1Н-бензимидазола. Найдена зависимость высокой гемореологической активности от типа заместителей для производных N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (наиболее активное соединение РУ-1202), которая определяется наличием в положениях R<sub>1</sub> - 1-гидрокси-2,2,2-



трихлорэтильного заместителя, R<sub>2</sub> - 4-фторфенил и 3,4-дихлорфенил, R<sub>3</sub> - пирролидиноэтила и диметиламиноэтила.

Производные бензимидазола оказывают влияние на патогенетические звенья агрегации тромбоцитов и коагуляционный гемостаз. Среди них найдены соединения, играющие важную роль как в процессах свертывания крови и восстановления поврежденных кровеносных сосудов, так и активирующие противосвертывающую систему.

Так, аналог бензимидазола - вещество 5-{2-[5-(4-трет-бутил-фенил)-фуран-2-ил]-3Н-бензоимидазол-5-илметил}-2-тиоксо-тиазолидин-4-она - является мощным агонистом тромбопоэтина, который стимулирует пролиферацию клеток-предшественников мегакариоцитов в зрелые клетки с последующей фрагментацией для образования тромбоцитов [Safonov, 2006].

Среди производных БИ, снижающих свертываемость крови, с учетом возможных механизмов действия, найдены соединения с ингибирующей активностью в отношении фактора Ха (FXA), комплекса фактора VIIa/тканевого фактора (FVIIa/TF), ФАТ, фермента тромбоксансинтетазы и тромбоксановых рецепторов, ФДЭ III в тромбоцитах, кальмодулина, цАМФ-зависимой ПКА тромбоцитов, ПКС [Спасов, 2002, 2012; Кучерявенко, 2013; Черников, 2013а, 2013б; Cui, 2002].

Например, Cui [2002] опубликовал данные о выраженных свойствах ингибитора тромбина - соединения C-[1-(тетрагидропиран-2-ил)-1Н-бензимидазол-5-ил] метиламина. KW-3635 (натрий (Е)-11-[2-(5,6-диметил-1-бензимидазолил)этилиден]-6,11-дигидродибенз[b,e]-оксепин-2-карбоксилат моногидрат) проявляет антагонизм к ТР-рецепторам тромбоксана A<sub>2</sub> [Спасов, 2002]. Выраженная рецепторная P2Y<sub>1</sub>-антагонистическая активность присуща N<sup>1</sup>-морфолиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазолам [Спасов, 2012; Патент РФ RU 2391345; Черников, 2013а, 2013б]. Среди ИмБИ наиболее перспективными по антиагрегантному действию *in vitro* и *in vivo* являются производные N<sup>2</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола [Патент РФ RU 2440814; Кучерявенко, 2013].

### **Гипотензивные свойства**

В современной зарубежной литературе широко представлена информация о гипотензивной активности производных БИ [Vyas, 2010; Bansal, 2012; Narasimhan, 2012; Barot, 2013; Shah2, 2013].

В 40-х годах Порай-Кошиц, Гинзбург и Эфрос синтезировали 2-бензил-1*H*-бензимидазола гидрохлорид - дибазол (тромаседан) - соединение, обладающее прямыми миотропными спазмолитическими свойствами в отношении гладкой мускулатуры сосудов и внутренних органов. Закусов (1978) связывал протекторное действие дибазола со стимуляцией нейротрофических влияний, повышающих адаптационные возможности организма [Рамш, 2011]. В публикации Спасова [1999] упоминаются противовоспалительные, антиагрегантные, обезболивающие и противосудорожные, адаптогенные свойства этого препарата. В настоящее время описаны противоаритмические, противоглистные, иммуномодулирующие эффекты.

В качестве антигипертензивного препарата известен мибефрадил (соединение Ro40-5967; (1*S*,2*S*)-2-[2-[[3-(1*H*-бензимидазол-2-ил)пропил]метиламино]этил]-6-фтор-1,2,3,4-тетрагидро-1-изопропил-2-нафтиловый эфир метоксиуксусной кислоты гидрохлорид), блокирующий кальциевые каналы Т-типа [Сидоренко, 1998; Спасов, 1999, 2002].

В настоящее время среди производных БИ наибольший интерес представляют блокаторы ангиотензиновых АТ<sub>1</sub>-рецепторов, поскольку являются безопасными, специфическими и эффективными антигипертензивными препаратами. Данная группа обладает кардиопротекторными свойствами [Guthrie, 2009; Hoogwerf, 2010; Holdiness, 2011], которые связаны с сохранением структуры и функции левого желудочка, предотвращением развития фиброза и гиперактивации симпатической нервной системы, потенцированием положительных влияний брадикининовой системы. Кроме того, некоторые блокаторы ангиотензиновых АТ<sub>1</sub>-рецепторов производные БИ, в частности телмисартан, обладают свойствами частичного агониста PPAR<sub>γ</sub> рецепторов (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), что расширяет возможности их применения [Mizuno, 2010; Herbst, 2012].

Одними из первых блокаторов АТ<sub>1</sub>-рецепторов являются производные 2-бутил-бензимидазол-7-карбоновой кислоты. Этерификация карбоксильной группы соединения CV-11974 в положении С<sup>7</sup> привело к созданию активного при пероральном введении и продолжительного действия блокатора АТ<sub>1</sub> рецептора - кандесартана цилексетила, используемого в настоящее время в клинической практике (рис. 1.1).

В исследовании [Estrada-Soto, 2006] на изолированных кольцах аорты крыс производных 2-(*o*-,*p*-замещенного фенил)-1*H*-бензимидазола с различными заместителями

у углерода в 5- и 6-положениях (-H, -CH<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>) найдены соединения [2-(5-нитро-1H-бензимидазол-2-ил)фенол] и 2-(4-метоксифенил)-5-нитро-1H-бензимидазола с высокой активностью блокатора АТ<sub>1</sub>-рецептора.

Среди серии 5-(алкил и арил)карбоксамидных производных бензимидазола соединение (2-бутил-5-амино-пропионил-бензимидазол-1-илметил) бифенил-2-карбоновой кислоты, обладало гипотензивной активностью. Кроме того, при оценке результатов авторы предположили, что фармакологическая активность была обратно пропорциональна размеру алкильных и арильных заместителей [Shah1, 2008].

Соединения с АТ<sub>1</sub>-ингибирующей активностью найдены среди 5-алкил-сульфамоилпроизводных бензимидазола [Kaur2, 2008]; 4'-(5,6-замещенных-2-трифторметил-бензимидазол-1-ил-метил)-бифенил-2-карбоновой кислоты; 4'-(6-метокси-2-замещенных бензимидазол-1-илметил) бифенил-2-карбоновой кислоты; [2-замещенных)-амино]-фенил}-1-[2-(1H-тетразол-5-ил)-бифенил-4-илметил]-1H бензоимидазол-5-иламин; 2[(замещенных фенил амино)-фенилметил]-1-[2'-(1H-тетразол-5-ил)-бифенил-3-илметил]-1H бензо-имидазол-5-иламин; 4-[2-(фенил-замещенных аминметил)-бензимидазол-1-илметил] бифенил-2-карбоновой кислоты [Sharma1, 2010a, 2010b, 2010c, 2010d, Sharma2, 2010]; 5-метил-2-оксо-1,3-диоксол-4-ил метильные эфиры БИ (в том числе телмисартан) [Guo, 2008; Vyas, 2010].

При анализе зависимости АТ<sub>1</sub>-антагонистической активности от химической структуры был построен скаффолд<sup>1</sup> и определены заместители, определяющие высокий уровень активности [Bansal, 2012; Barot, 2013].

Изучены гипотензивные свойства производных ИмБИ. Активные соединения найдены среди дигидрохлоридов 3-(2,2,2-трихлор-1-гидроксиэтил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 9-диалкиламиноэтил-2-окси(диокси)-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 2-метоксии2-оксифенилзамещенных 1-диалкил-аминоалкилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, 2-метоксифенилзамещенных 9-диалкил-аминоэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, солей 3-ацетил-2-г-9-диалкиламино-этилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов [Анисимова 2005а, 2005б, 2006, 2009, 2010].

<sup>1</sup> Скаффолд (медицинская химия) – базовая молекула (кор, ядро), модифицированная некоторыми структурными фрагментами (например, заместителями), присутствие которых может определять наличие или высокий уровень заданного вида биологической активности.

### Антиоксидантное действие

Препараты, обладающие антиоксидантными и антирадикальными свойствами, активны в комплексном лечении различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых.

Впервые нашли эффективные антиоксиданты среди производных 5-гидроксibenзимидазола и 5-гидрокси-2-метилбензимидазола [Cole, 1974]. Показано, что включение тиадиазолов, триазолов, тиосемикарбазидов в 1-положении бензимидазола способствует антиоксидантной активности. Монодентатные и бидентатные лиганды, полученных от  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  координационных соединений с 2-замещенными бензимидазолами, оказались активны в отношении NO и супероксиддисмутаза [Azam, 2009]. Ингибирование перекисного окисления липидов обнаружено у шиффовых оснований бензимидазола [Neochoritis, 2011]. Производные 4-карбоксамидоБИ обладают антирадикальной активностью, в основе которой ингибирование поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) [Kalai, 2009].

Антиоксидантные свойства выявлены у производных (гетероарил) имидазо [1,2-*a*] бензимидазола, N-ацилметил производных 9H-2,3-дигидроимидазо- и 10H-2,3,4,10 тетрагидропиримидо-[1,2-*a*] бензимидазола [Анисимова, 2006, 2009, 2010, Патент РФ RU 2443704]; производных N-метил-1,3,4-тиадиазол-2-амин и 4-метил-1,2,4-триазол-3(4H)-тиона [Kus, 2008]; производного бензимидазол гомопиперазина [Nakano, 1999]; 6-фторо-5-замещенных БИ [Alagoz, 2004].

Поиск соединений с высокой антиоксидантной активностью среди производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов показал, что сочетание  $\pi$ -избыточности в гетероциклическом ядре с заместителями, усиливающими донорно-акцепторные свойства данных веществ, в частности, с фенольным или полифенольным, объясняет их высокую антиоксидантную активность [Анисимова, 2010; Патент РФ RU 2443704]. Активные антиоксидантные вещества обнаружены среди производных пирроло[1,2-*a*]бензимидазолов, имеющих в качестве заместителей фенильные, метокси- и диметоксифенильные заместители [Косолапов, 2013].

### Нейропротекторные эффекты

Производные безимидазола и имидазобензимидазола обладают церебропротекторными свойствами. Они определены сосудистыми, антитромбогенными и

метаболическими свойствами.

Известный анксиолитический препарат афобазол обладает выраженной нейропротекторной активностью, что подтверждено как в экспериментальных исследованиях *in vivo* и *in vitro* (на моделях глобальной и ишемии средней мозговой артерии; на культуре нейронов гиппокампа при оксидативном стрессе, вызванном перекисью водорода и воздействием глутамата) [Силкина, 2006; Ганышина, 2009; Середенин, 2006, 2009а, 2009б; Мирзоян, 2010, 2014], так и клинических [Иванов, 2010; Реутова, 2010; Колуцкая, 2013].

Механизм церебропротекторного действия связан с тем, что соединение предотвращает снижение содержания нейротрофина BDNF (ключевого белка, контролирующего выживаемость и функциональную активность нейронов) и NGF в структурах мозга экспериментальных животных с оксидативным стрессом и культурах нейронов с глутаматной токсичностью [Антипова, 2009; Разумная 2014]. Афобазол обладает антирадикальным и вазопротекторным эффектами. Препарат снижает концентрацию малонового диальдегида, церуллоплазмину, активность каталазы, повышает активность супероксиддисмутазы, уровень экспрессии фермента eNOS и концентрацию суммарных метаболитов NO, увеличивает синтез стресс-белка HSP70 [Силкина, 2006].

Соединение РУ-185 (эноксифол) - дигидробромид 2-(3,4-диоксифенил)-9-диэтил-аминоэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола - представляет собой активное антиоксидантное церебропротекторное средство, эффективное при гипоксических и ишемических состояниях различного генеза [Спасов, 2005]. Механизм действия эноксифола связан с антиоксидантной активностью, гемобиологическими свойствами и улучшением микроциркуляции. В условиях тотальной ишемии головного мозга эноксифол снижал агрегацию эритроцитов, повышал их осмотическую и кислотную резистентность. Корректировал состояние гиперагрегации тромбоцитов после ишемии-реперфузии головного мозга. Повышал уровня локального мозгового кровотока, практически не влияя на системное артериальное давление.

Известны церебропротекторные свойства у производного N<sup>9</sup>-ИмБИ - ритмидазола. Он увеличивает объемную скорость мозгового кровотока, повышает устойчивость животных к циркуляторной гипоксии, улучшая течение постишемического периода,

тормозит развитие постишемических цереброваскулярных феноменов, восстанавливает нарушенные показатели окислительного и трансапикалярного обменов [Кулешова, 1993].

Церебропротекторные противоишемические свойства найдены у ингибиторов натрий-водородного обменника (NHE). В предполагаемую терапевтическую группу для лечения инсульта международной базы данных Thomson Reuters Integrity [2011] включены 11 производных бензимидазола.

### **Кардиопротекторные свойства бензимидазолов**

Важная роль в снижении смертности от сердечно-сосудистых заболеваний уделяется кардиопротекции, что способствует профилактике отдаленных последствий, позволяет улучшить прогноз заболевания и может привести к увеличению продолжительности жизни и улучшению ее качества [Моисеев2, 2012а, 2012б].

Понятие кардиопротекции включает любое экстренное и длительное вмешательство, результатом которого является ограничение зоны некроза миокарда, снижение кардиологической смертности, частоты развития сердечной недостаточности, уменьшения риска возникновения желудочковых аритмий [Борджи, 2007].

Основные подходы кардиопротекции направлены на угнетение роста атеросклеротических процессов в сосудах и сохранение проходимости коронарных артерий; повышение толерантности к гипоксии; замедление ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования миокарда, приводящего к уменьшению гипертрофии, нормализации геометрии камер сердца и восстановлению электрофизиологической гомогенности миокарда.

Таковыми свойствами обладают современные бета-блокаторы, ингибиторы АПФ и блокаторы  $AT_1$ -рецепторов, статины, антитромботические препараты и другие. Поиск кардиопротекторов, влияющих на известные и новые мишени, активно проводится среди производных БИ.

### **Инотропные свойства БИ**

$Ca^{2+}$  играет главную роль в регуляции сокращения кардиомиоцитов и является важной мишенью агентов, нормализующих сократимость миокарда. Для дифференцировки механизмов действия различных инотропных средств проведены исследования переносчиков  $Ca^{2+}$  и сократимости сердца в интактном миокарде с помощью акворина и

флюоресцентных красителей в одиночных миоцитах [Endoh, 2008]. Выделили основные механизмы процесса "возбуждение-сокращение": восходящий (внутриклеточная мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  и последующий его перенос), центральный ( $\text{Ca}^{2+}$  связывается с тропонином С, вызывает поперечное скольжение) и нисходящий (включает Са-зависимую регуляцию поперечного скольжения тонких и толстых филаментов и Са-независимую прямую модуляцию кинетики поперечного мостика).

Было выявлено, что к активаторам  $\text{Ca}^{2+}$  относятся дигиталис, катехоламины (добутамин, дофамин) и небензимидазольные производные ингибиторы фосфодиэстеразы-3 (милринон, амринон, орпринон, эноксимон, пироксимон). Они вызывают положительный инотропный эффект через восходящий механизм, облегчая активацию через цАМФ-зависимые и цАМФ-независимые пути переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в интактных клетках миокарда и малоэффективны при ацидозе. При этом они могут вызвать избыток внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что ведёт к аритмиям, повреждению клеток миокарда и, как следствие, смерти клеток. Кроме того, катехоламинам и ингибиторам ФДЭ-3 для поддержания уровня  $\text{Ca}^{2+}$  необходима дополнительная метаболическая энергия.

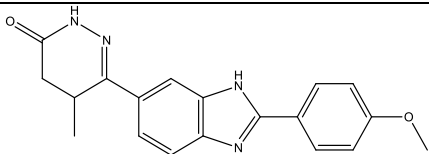
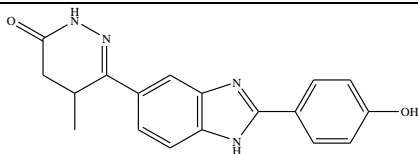
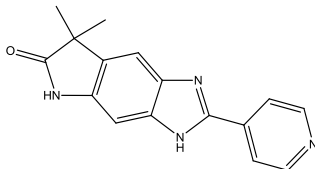
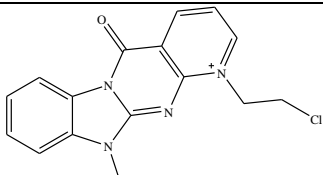
Сенситайзеры  $\text{Ca}^{2+}$  способны активировать свой кардиотонический эффект через центральный и нисходящий механизмы, увеличивая сродство  $\text{Ca}^{2+}$  к тропонину С или стабилизируя комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -тропонин С, а так же облегчая регуляцию тонких филаментов. Препараты данной группы имеют высокую терапевтическую перспективу для лечения сократительных дисфункций при ХСН и ишемии сердца, так как у них высокий энергетический потенциал и меньший риск переизбытка  $\text{Ca}^{2+}$ , а так же поддерживают свою активность в патологических состояниях.

Свойствами активаторов и сенситайзеров  $\text{Ca}^{2+}$  обладают альфа-адреностимуляторы, эндотелин, ангиотензин-II, левосимендан, а так же пимобендан и адибендан (рис. 1.2) - ингибиторы ФДЭ-3 производные БИ [Гуревич, 2008; Endoh, 2008]. Они усиливают инотропную функцию в результате повышения внутриклеточного кальция и увеличения чувствительности миофиламентов к кальцию. Кроме того, данная группа препаратов понижает порог концентрации кальция, при котором наступает инициация скольжения кардиальных волокон актина [Endoh, 2008].

Пимобендан проявляет положительный инотропный эффект за счет повышения

чувствительности миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  и избирательного ингибирования ФДЭ-3. Оба эффекта проявляются при одной концентрации. Пимобендан обладает прямым эффектом на тонкие филаменты, снижая порог  $\text{Ca}^{2+}$  при активации актина *in vitro*, указывая на влияние центральных и нисходящих механизмов [Rao, 2009]. Пимобендан сочетает инотропную активность и вазодилатирующие свойства (расширяет венозные и артериальные сосуды) - кардиотонический вазодилататор (инодилататор) [Gordon, 2006; Boswood, 2010].

Подобным эффектом обладает его активный метаболит UD- CG212 C1 [4,5 дигидро-6 [2-(4-гидроксифенил)-1H-бензимидазол-5-ил]-5-метил-3(2H)пиридазинон [Endoh, 2002] (рис. 1.2).

 <p><b>Пимобендан - (UD-CG 115-B5);</b> 4,5-дигидро-6-[2-(4-метоксифенил)-1H-бензимидазол-5-ил]-5-метил-3(2H)-пиридазинон</p>	 <p><b>UD-CG212CL</b> 4,5-дигидро-6 [2-(4-гидроксифенил)-1H-бензимидазол-5-ил]-5-метил-3(2H)-пиридазинон</p>
 <p><b>Адибендан</b> (5,7-дигидро-7,7-диметил-2-(пиридин-4-ил)пирроло[2,3-f]-бензимидазол-6(1H)-он)</p>	 <p>1- (β-хлорэтил) -5,11-дигидро-11-метил-5-оксопиродо [2',3': 4,5] пириמידо [1,2- a] бензимидазол-1-ия бромид [Dorigo, 2000]</p>

**Рис. 1.2. Химические структуры ингибиторов фосфодиэстеразы - производных бензимидазола.**

Известны исследования по поиску избирательных сенситайзеров  $\text{Ca}^{2+}$  без значительного влияния на ФДЭ-3 среди производных БИ. Проводили конструирование молекул БИ, структурно похожих с такими, как сульмазол, кофеин и пимобендан. Подобные свойства найдены у соединения 1-(β-хлорэтил)-5,11-дигидро-11-метил-5-оксопиродо[2',3':4,5]пириמידо[1,2-a]бензимидазол-1-ия бромид. Оно вызывало устойчивый инотропный эффект в концентрациях, необходимых для сенсibilизации  $\text{Ca}^{2+}$ , не влияя на активность ФДЭ III и частоту сердечных сокращений [Dorigo, 2000] (рис. 1.2).

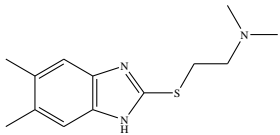
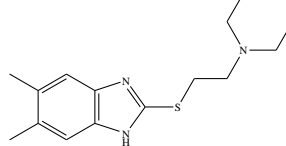
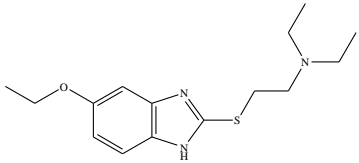
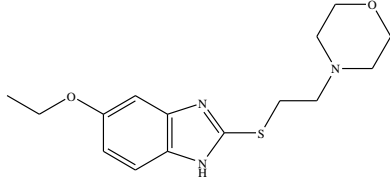


Экспериментальное изучение ингибирования производными бензимидазола и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола фосфодиэстеразы цАМФ проводились в лаборатории ферментных систем НИИ по биологическим испытаниям химических соединений (Купавна, Московской обл.) к. м. н., с. н. с. Р.Е. Либинзон [Анисимова, 1987] и к. б. н. О.Е. Ватолкиной [1984, 1992]. Эксперименты по исследованию антикальмодулиновой активности и влиянию на фосфодиэстеразу цАМФ новых конденсированных производных бензимидазола выполнены в лаборатории метаболизма сердца НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН д.м.н. Н.П. Ларионовым и к.м.н. И.А. Феоктистовым. Исследования показали наличие антифосфодиэстеразной активности у 2-гетарилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 1- и 10-N-замещённых 1(10),2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола [Анисимова, 2002а, 2002б], 9-диалкиламиноэтилимидазо [1,2-*a*]бензимидазолов [Анисимова, 2005б, 2006, 2010].

### **Антиаритмическая активность БИ**

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАН длительное время изучают производные 2-меркаптобензимидазола. Наибольшую активность проявили афобазол и соединения СМ-251, СМ-266, брадизол (СМ-345) [Турилова, 2010]. Данные субстанции отличаются заместителями в положениях С<sup>5</sup>, С<sup>6</sup> и/или положении С<sup>2</sup> (химические структуры представлены на рис. 1.3).

На аконитиновой модели аритмий соединения значительно превосходили по активности лидокаин и новокаинамид, однако уступали этмозину, т.е. обладали свойствами блокаторов быстрых натриевых каналов. При этом афобазол по активности значительно превосходил СМ-345, СМ-266 и СМ-251, ЕД<sub>50</sub> составила 0,52 мг/кг [Турилова, 2010]. При оценке зависимости эффекта от химической структуры, было показано, что замена диметиламинного (СМ-251) на диэтиламинный (СМ-266) фрагмент в боковой цепочке у второго атома углерода, и/или замена двух метильных групп (СМ-266) положениях С<sup>5</sup>, С<sup>6</sup> БИ на этокси группу (СМ-345) не оказывает значимого влияния на уровень антиаритмической активности. Однако наличие в молекуле афобазола в боковой цепочке в положении С<sup>2</sup> остатка насыщенного гетероцикла морфолина приводит к выраженному увеличению антиаритмического действия.

 <p>2-(5,6-диметил-1H-бензо[d]имидазол-2-илтио)-N,N-диметилэтанамин (соединение SM-251)</p>	 <p>2-(5,6-диметил-1H-бензо[d]имидазол-2-илтио)-N,N-диэтилэтанамин (соединение SM-266)</p>
 <p>2-(5-этоксид-1H-бензо[d]имидазол-2-илтио)-N,N-диэтилэтанамин (брадизол - соединение SM-345)</p>	 <p>5-этоксид-2-(2-морфолиноэтилтио)-1H-бензо[d]имидазол (афобазол)</p>

**Рис. 1.3. Структурные формулы наиболее активных кардиопротекторных соединений - производных бензимидазолов [Турилова, 2010] (представлены в виде оснований)**

На модели хлоридкальциевой аритмии афобазол в 1,5 раза превосходит лидокаин, но уступает верапамилу. Выявлена его антифибрилляторная активность при 7-минутной окклюзии с последующей реперфузией коронарной артерии у крыс [Цорин, 2009; Столярчук, 2010]. По широте терапевтического действия афобазол превосходит такие антиаритмические препараты как лидокаин, новокаиномид, этмозин, верапамил.

В дальнейшем были показаны противоишемические эффекты афобазола у животных с хронической ишемией миокарда, вызванной перевязкой левой коронарной артерии [Цорин, 2009; Крыжановский, 2012, 2013] и с острой изопротереноловой ишемией миокарда [Середенин, 2013].

Брадизол обладает выраженным антиаритмическим, противофибрилляторным и противоишемическим действием. Он был отнесен к специфическим брадикардическим средствам (V класс антиаритмических средств). Препарат уменьшает скорость медленной диастолической деполяризации в пейсмекерных клетках синусового узла, вызывает значительную брадикардию и практически не влияет на другие показатели гемодинамики и деятельности сердца (артериальное давление, минутный объем, сократительную функцию сердца) [Каверина, 2004].

Наличие у производных бензимидазола кардиопротекторных свойств подтверждено в исследованиях, проведенных в ВолгГМУ и НИИ фармакологии ВолгГМУ. Имеющиеся данные подтверждают наличие у них противоишемических, антифибрилляторных, метаболических и антигипоксических свойств [Спасов, 1984, 1999; Кириллов, 1996; Лещакина, 1996; Шабашева, 1997; Петров, 2003].

Ранее более чем у 300 соединений было изучено влияние на рефрактерность изолированных предсердий крыс (способность увеличивающих продолжительность рефрактерного периода) [Спасов, 1984]. Была выявлена зависимость фармакологической активности от физико-химических свойств (липофильности, электроностерического параметра молекулярной рефракции и стерического параметра Аустела заместителей молекулы). Наиболее активным было признано соединение РУ-36 (ритмидазол) - дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2-третичнобутилимидазо[1,2- *a*]бензимидазол. Он сочетает свойства противоаритмических средств I, III и IV классов по классификации Vaughan Williams (1984).

На этапе доклинических испытаний было показано, что ритмидазол угнетает трансмембранные ионные миокардиальные токи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ . По влиянию на медленный кальциевый ток ритмидазол превосходит дилтиазем, но уступает изоптину. По ингибированию быстрого входящего тока  $\text{Na}^+$  ритмидазол превосходит новокаионамид и хинидин, а по угнетению выходящего калиевого тока - хинидин. Обладает незначительным холинолитическим эффектом [Спасов, 1999].

В исследованиях *in vitro* ритмидазол увеличивал эффективный рефрактерный период изолированных предсердий. *In vivo* оказался активным на экспериментальных моделях суправентрикулярных и вентрикулярных аритмий, в том числе ишемического генеза. Препарат ограничивал зону некроза при окклюзии левой коронарной артерии [Спасов, 1984].

На этапе клинических испытаний расширены знания о механизме действия ритмидазола. Показано, что он, в большей степени, чем новокаионамид и кордарон снижает атриовентрикулярную (АВ) и внутрижелудочковую проводимость, проводимость  $\alpha$ - и  $\beta$ -путей А-В узла, удлиняет эффективный рефрактерный период левого предсердия, п. Кента и уменьшает “зону тахикардии” у больных [Кириллов, 1996; Петров, 2003].

По результатам клинических испытаний ритмидазол является эффективным средством для лечения наджелудочковых и желудочковых аритмий. Активность при различных патологиях составляет 50-100% [Кириллов, 1996; Лещаккина, 1996; Шабашева, 1997; Петров, 2003], в сравнении с амиодароном, эффективность которого при различных патологиях - 60-80% [Меркулова, 1997]. Преимуществом ритмидазола по результатам клинических испытаний является активность при WPW- синдроме [Кириллов, 1996]. Препарат показан для купирования пароксизмальных суправентрикулярных тахиаритмий (приступов АВ-узловой реципрокной тахикардии на фоне синдрома Вольфа-Паркинсона-Уайта, приступов фибрилляции и трепетаний предсердий) у больных с ИБС, артериальной гипертензией, врожденных и приобретенных пороках сердца, кардиомиопатиях и других заболеваниях миокарда, ревматизме, врожденных аномалиях проводящей системы.

### **Противоишемическое действие БИ**

#### ***Метаболические и антигипоксические эффекты***

Антиоксидантные свойства БИ описаны в главе 1.2.3. Известна информация о кардиопротекторных (метаболических и антигипоксических) эффектах данной группы соединений, изученных в ВолГМУ.

Так соединение РУ-180 - 3,4-диметоксифенил 9-диэтиламиноэтил имидазо(1,2-а) бензимидазола азотнокислая соль - повышало устойчивость миокарда к гипоксии (ограничивало повреждение) в условиях изадриновой интоксикации и коронарной окклюзии. Механизм его действия заключается в мембранном (увеличивает уровень цАМФ, оказывает антиоксидантное действие, тем самым стабилизируя клетки миокарда) и метаболическом (нормализует анаэробный гликолиз) эффектах [Спасов, 1984].

Кардиопротекторные свойства соединения РУ-85 - 9-диэтиламиноэтил-2-пара-оксифенилимидазо(1,2-а) бензимидазола дигидробромида - связано с адаптогенным действием. Вещество оказывает стресс-регулирующее влияние на клеточном (нормализует систему энергопродукции на уровне клеток, стабилизирует мембраны клеток и митохондрий) и органном (повышает устойчивость миокарда к гипоксии, увеличивает сопротивляемость сердца к стрессорным повреждениям, нормализует кардиодинамику, препятствует развитию нарушений ритма при хлоридкальциевой и оубаиновой

интоксикациях, снижает размеры зоны некроза миокарда в условиях изадриновой интоксикации и коронарной окклюзии) уровнях [Спасов, 1984].

В исследованиях *in vivo* и *in vitro* Панченко [1990] протекторные свойства обнаружены у соединения РУ-185 - 2-(3,4 диоксифенил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола дигидробромида и соединения РУ-596 - 2-(4-хлорфенил)-1-диэтиламиноэтил имидазо[1,2-*a*]бензимидазола дигидрохлорида. В основе механизма действия лежит антиоксидантный эффект. В исследованиях *in vitro* вещества РУ-185 и РУ-596 ограничивали развитие нарушений ритма изолированных предсердий, вызванных перекисью водорода. *In vitro* вещества РУ-185 и РУ-596 стабилизировали мембраны эритроцитов. В исследованиях *in vivo* была показана высокая эффективность соединений при различных экспериментальных моделях нарушений ритма, в том числе в условиях ишемии/реперфузии миокарда. Соединение РУ-185 увеличивает толерантность сердца к ишемии, ограничивает зону некроза при экспериментальном инфаркте миокарда.

Среди производных пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола кардиопротекторные свойства выявлены у вещества РУС-38 - β-диэтиламинный эфир 2,4-диметилпиразоло[1,5-*a*]бензимидазолил-3-карбоновой кислоты гидрохлорида. Соединение оказывало выраженный антиаритмический эффект на суправентрикулярных моделях нарушений ритма. Механизм действия связан с влиянием на трансмембранные токи калия и натрия, а также повышает устойчивость мембран эритроцитов к повреждающему воздействию продуктов перекисного гемолиза [Чернов, 1990].

### ***Влияние на натрий-водородный обменник 1-й изоформы (NHE-1)***

NHE-обменники участвуют во множестве сложных физиологических и патологических процессов и заболеваний, таких как регуляция клеточного pH, клеточная миграция, апоптоз [Slepko, 2007; Schelling, 2008], гипертрофия [Malo, 2006; Cingolani, 2011; Fliegel, 2011; Wakabayashi, 2013], повреждения, связанные с ишемией и реперфузией [Писаренко, 2004, 2005; Allen, 2003; Andreadou, 2008], эндотелиальная дисфункция, сахарный диабет и его осложнения [Балаболкин, 2001; Дедов, 2006; Schelling, 2008], сердечная недостаточность [Cingolani, 2007, 2011], нарушение мозгового кровообращения [Luo, 2007], злокачественные опухоли [Malo, 2006].

Наибольший интерес представляет использование ингибиторов NHE1 в фармакологической защите сердца. Ишемическая активация обменника вызывает внутриклеточную кальциевую перегрузку, приводящую к повреждению кардиомиоцитов [Писаренко, 2004; Slepков, 2007; Fliegel, 2008, 2009]. Селективное ингибирование NHE-1 сарколеммы может уменьшить повреждение и улучшить восстановление функции органов [Писаренко, 2004, 2005; Спасов, 2014; Avkiran, 2003; Fliegel, 2008]. Возможным спектром применения рассматривают: стенокардию, инфаркт миокарда, коронарное шунтирование, пересадку сердца, аритмии, хроническую сердечную недостаточность, болезни коронарных сосудов, нарушение мозгового кровообращения, ишемический инсульт.

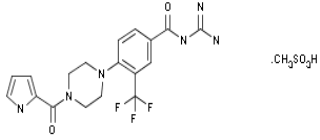
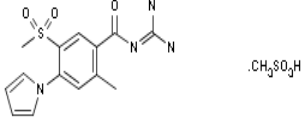
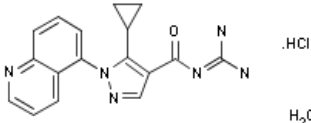
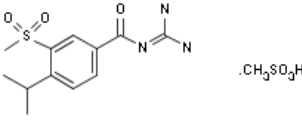
NHE являются мишенями для ингибирования амилоридом и его производными (DMA, EIPA, MIBA и HMA), а также новейшими производными бинзилгуанидина, такими как NOE-642 (карипорид) и его производное NOE-694, энипорид (EMD-85131), сабипорид (BIB-722). Известны бициклические производные гуанидина, содержащие хинолин (зонипорида (CP-597396)), MS 31038), индол (SM 20220, SM 20550, SMP-300), бензоксазинон (КБ-R9032), дигидробензофуран (BMS 284640), тетрагидронафтален (T-162559), циклогептапиридин (TY-12533) и другие. Международная база Thomson Reuters Integrity (2011) содержит 262 гуанидинсодержащих производных, обладающих NHE-ингибирующей активностью. На стадии клинических испытаний находятся 6 соединений, основные из которых представлены в таблице 1.1.

Изоформы NHE имеют различный аффинитет к этим ингибиторам со следующим порядком чувствительности в сходных экспериментальных условиях:  $NHE1 \geq NHE2 > NHE5 > NHE3 > NHE4$ .

В дальнейшем появились данные о наличии способности ингибировать  $Na^+/H^+$  обменник у производных бензимидазолов [Zhang, 2007]. Известны 42 производных бензимидазола, обладающих NHE-ингибирующей активностью [Thomson Reuters Integrity, 2011], примеры химических структур которых представлены в табл. 1.2. Как и у предыдущих видов активности изменение заместителей касается  $N^1$ ,  $C^2$ ,  $C^5$ ,  $C^6$ . Обращает внимание наличие свободной или встроенной гуанидиновой группировки во всех структурах.

Таблица 1.1

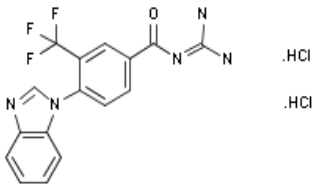
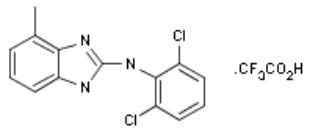
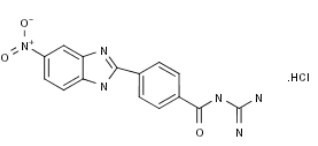
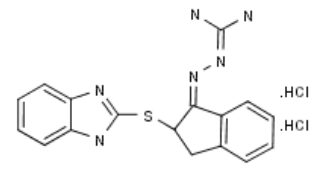
**Ингибиторы NHE1 в стадии клинических исследований**  
**(Международная база данных ингибиторов NHE Thomson Reuters Integrity, 2011)**

№	Препарат	Химическая структура	Фирма-разработчик	Клинические испытания		Предполагаемая терапевтическая группа
				фаза	нозоология	
1.	Сабипорида месилат (ВПВ-722)		Boehringer Ingelheim	I	Стенокардия	Средство для лечения стенокардии. Антиаритмический препарат. Кардиопротектор.
2.	EMR-62204	-	Merck KGaA	II	Сердечная недостаточность	Средство для лечения сердечной недостаточности
3.	Энипорида месилат (EMD-96785, YM-103, EMD-85131)		Merck KGaA	II	Инфаркт миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда
			Astellas Pharma	II	Инфаркт миокарда	
4.	Зонипорида гидрохлорид (CP-597396, EMD-392426)		Pfizer	III	Ишемия миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда, заболеваний коронарных артерий и атеросклероза
5.	Сарипорида месилат (Ное-642)		Sanofi-aventis	III	Инфаркт миокарда	Средство для лечения острого инфаркта миокарда. Средство, применяемое при проведении коронарного шунтирования
				III	Коронарное шунтирование	

На доклинической стадии разработки находятся 5 соединений с кардиотропной активностью (предполагаемая терапевтическая группа: гипертония, заболевания коронарных артерий и атеросклероз, кардиопротекторная активность при ишемии/реперфузии).

Таблица 1.2

**Примеры производных бензимидазола, обладающих NHE-ингибирующей активностью, их стадия исследования  
(по данным Thomson Reuters Integrity, 2011)**

№	Название	Химическая структура	Код базы	Терапевтическая группа
<i>А. Разработчик sanofi-aventis (Originator), стадия: биологический тест</i>				
<i>N<sup>1</sup>-производные</i>				
1.	N2 - [4 - (1H - бензимидазол - 1 - ил) - 3 - (трифторметил) бензоил]гуанидина дигидрохлорид		304545	Стенокардия
<i>C<sup>2</sup>-производные</i>				
2.	N - (2,6 - дихлорфенил) - 4 - метил - 1H - бензимидазол - 2 - амина трифторацетат		322786	Инсульт, почечная недостаточность, апное сна
<i>Б. Разработчик China Pharmaceutical University (Originator) стадия: доклиническая</i>				
<i>C<sup>2</sup>-производные</i>				
1.	N - [4 - (5 - нитро - 1H - бензимидазол - 2 - ил)бензоил] гуанидина гидрохлорид		452945	Гипертония, заболевания коронарных артерий и атеросклероз
2.	2 - [2 - (1H - бензимидазол - 2 - илсульфанил) - 2,3 - дигидро - 1H - инден - 1 - илиден] гидразин карбоксамидина дигидрохлорид		672272	Кардиопротекция при ишемии/ реперфузии

### 1.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, не возникает сомнений, что бензимидазол - активное гетероциклическое азотсодержащее соединение с широким потенциалом биологической активности. Анализ описанных выше литературных данных еще раз подтверждает, что бензимидазол является "привилегированной подструктурой", молекулой, способной к



взаимодействию с высоким сродством со многими биологическими мишенями, при модификации которой проявляются различные биологические эффекты. Кроме того известны биоизостерические свойства производных бензимидазола с природными нуклеотидами, что позволяет им легко взаимодействовать с биополимерами в природе. Оптимизация заместителей вокруг ядра бензимидазола привела к созданию ряда активных лекарственных препаратов, применяемых в настоящее время в клинике. Среди них есть соединения с кардиотропными эффектами. Последнее время большое внимание уделяется поиску современных кардиопротекторов - соединений, обладающих антифибрилляторной, противоишемической и инотропной активностями.

Данные, представленные в отечественной и зарубежной литературе, свидетельствуют о большом кардиотропном потенциале производных БИ. Так, выявлены прямые (влияние на трансмембранные ионные токи нейронов пудовика и трабекул лягушки) и косвенные (местноанестезирующая, противосудорожная активности) признаки высокого сродства к ионным каналам, трансмембранным ионным обменникам, позволяющие предположить антиаритмические, антифибрилляторные, инотропные свойства. Наличие антиоксидантной, метаболитической, гемореологической активностей и антитромбогенного потенциала свидетельствуют о возможном противоишемическом и антиремондирующем эффектах.

Существуют определенные достижения в этой области. Первый антигипертензивный спазмолитик миотропного действия производное БИ - дибазол (тримаседан) - был синтезирован и изучен в России еще в 40-х годах 20 века. Сегодня для группы гипотензивных препаратов блокаторов АТ<sub>1</sub>-рецепторов уже построен скаффолд соединений с высокой активностью, в клинической практике применяют телмисартан и кандесартан. Показан кардиопротекторный эффект данных препаратов.

Современные исследования ингибиторов NHE, обладающих противоишемическими, антифибрилляторными, антиремондирующими свойствами, позволили выявить активные соединения среди гуанидинсодержащих производных БИ.

Изучены антиаритмические и антифибрилляторные свойства конденсированных и неконденсированных бензимидазолов. Наиболее активными являются производные 2-меркаптобензимидазола – афобазол – и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2- a]бензимидазола – ритмидазол, для которых завершены клинические испытания. В ВолгГМУ накоплена значительная база

экспериментальных данных о влиянии соединений на усвоение навязанного ритма изолированными предсердиями крыс. Предприняты предварительные попытки провести оценку зависимости биологического эффекта от химической структуры и построить скаффолд "активного антиаритмического соединения" [Спасов, 1984].

Инотропный эффект производных бензимидазола пимобендана и адибендана определен свойствами активаторов и сенситайзеров  $\text{Ca}^{2+}$ . Для них характерен высокий энергетический потенциал и меньший риск переизбытка  $\text{Ca}^{2+}$ , а так же сохранение активности в условиях ишемии и сократительной дисфункции. Предварительные исследования инотропных свойств у новых конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола позволили выявить активные блокаторы ФДЭ цАМФ [Ларионов, 1988].

На основании проведенного анализа литературных данных, а так же предварительных собственных исследований, было показано наличие у производных бензимидазола кардиопротекторных свойств, что подтверждается противоишемическими, антиаритмическими и антифибрилляторными, кардиотоническими эффектами, способностью стабилизировать работу сердца в условиях гипоксии и снижать агрегацию тромбоцитов. Была выдвинута гипотеза возможного конструирования интегрального скаффолда, детерминирующего высокий уровень кардиопротекторной активности.

Таким образом, целесообразно использовать структуру бензимидазола для поиска новых кардиопротекторных соединений с учетом релевантных механизмов, связанных с влиянием на трансмембранные ионные токи, активность мембранных ферментов и обменников, метаболизм миокарда, ремоделирование структур. На основании приведенных данных, наибольший интерес представляет изучение противоишемических, антифибрилляторных, антиремоделирующих и инотропных эффектов новых ингибиторов NHE-1, антиаритмических и антифосфодиэстеразных средств.

## ГЛАВА 2. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ

Известно, что понятие кардиопротекции включает в себя комплекс вмешательств, направленных на сохранение или повышение жизнеспособности миокарда, улучшение прогноза заболевания, предупреждение развития осложнений (нарушений ритма, инфаркта миокарда, внезапной смерти), увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества [Шляхто, 2005; Симоненко, 2011]. Поэтому при поиске и создании новых кардиопротекторных веществ, необходимо оценивать целый комплекс релевантных механизмов действия с учетом влияния на трансмембранные ионные токи, активность мембранных ферментов, метаболизм миокарда, ремоделирование его структур.

Оптимизация подходов к поиску новых высокоактивных соединений является важным направлением современной фармакологии. Принципиальное значение имеет прогноз биологической активности химических соединений и анализ зависимости ее от химической структуры. Исследования *in silico* позволяют в короткие сроки оценить перспективность каждого химического класса как возможного химического ядра для направленного поиска активных веществ, провести сравнительный анализ спектров прогнозных и экспериментальных оценок фармакологической активности данных веществ [Зефирова, 2000]. Подобный подход позволяет выбрать вещества, которые максимально соответствуют, как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам, "образу" активного соединения, с учетом релевантных механизмов действия.

Современные подходы к созданию новых лекарственных препаратов связаны с исследованием так называемых «привилегированных» структур [Horton, 2003; DeSimone, 2004; Kamal, 2006; Han, 2011; Kim, 2014; Szabo, 2014]. Эти структуры представляют класс молекул, способных к взаимодействию с высоким сродством со многими биологическими мишенями и при модификации их свойства сохраняются. Класс конденсированных и неконденсированных бензимидазолов является перспективным для

создания на его основе новых препаратов [Bansal, 2012; Shah, 2013], о чем свидетельствует широкий спектр проявляемой биологической активности [Sambanthamoorthy, 2011; Lavrador-Erb, 2010; Галенко-Ярошевский, 2007, 2015; Спасов, 1984-2014; Palin, 2007; Hwu, 2008; Ansar, 2009; Chang, 2010; Nofal, 2011; Narasimhan, 2012; Jain, 2013], в том числе значительный процент высокоэффективных кардиотропных соединений [Чичканов, 1997; Каверина, 2004; Турилова, 2010; Perrone, 2005; Estrada-Soto, 2006; Zhang, 2007; Rao, 2009; Vyas, 2010; Navarrete-Vázquez, 2010]. Соответственно, на базе бензимидазола возможно нахождение общего химического скаффолда, который будет одинаково применим для видов активности, характеризующих кардиопротекторное действие.

В наших исследованиях для оценки зависимости между структурой и активностями, релевантными кардиопротекторной, были совместно использованы две интегрированные компьютерные системы прогноза биологических эффектов и метод подструктурного анализа – на первом этапе для оценки перспективности химических классов, а затем для выявления структурных фрагментов, ответственных за наличие высокой активности.

## 2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска соединений, обладающих кардиопротекторной активностью, были использованы методы, предназначенные для проведения экспериментальных исследований и компьютерной обработки информации\*.

К материалам и методам экспериментальных исследований относятся субстанции новых соединений, реактивы, методы изучения фармакологической активности, виды экспериментальных животных и тестовых объектов, а также используемые реактивы и препараты сравнения.

К материалам компьютерного анализа относятся массивы информации, содержащие структурные формулы известных лекарственных и биологически активных веществ, новых химических соединений и их фармакологическую активность.

В настоящем исследовании использовали 540 химических структур (приложение

---

\* Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

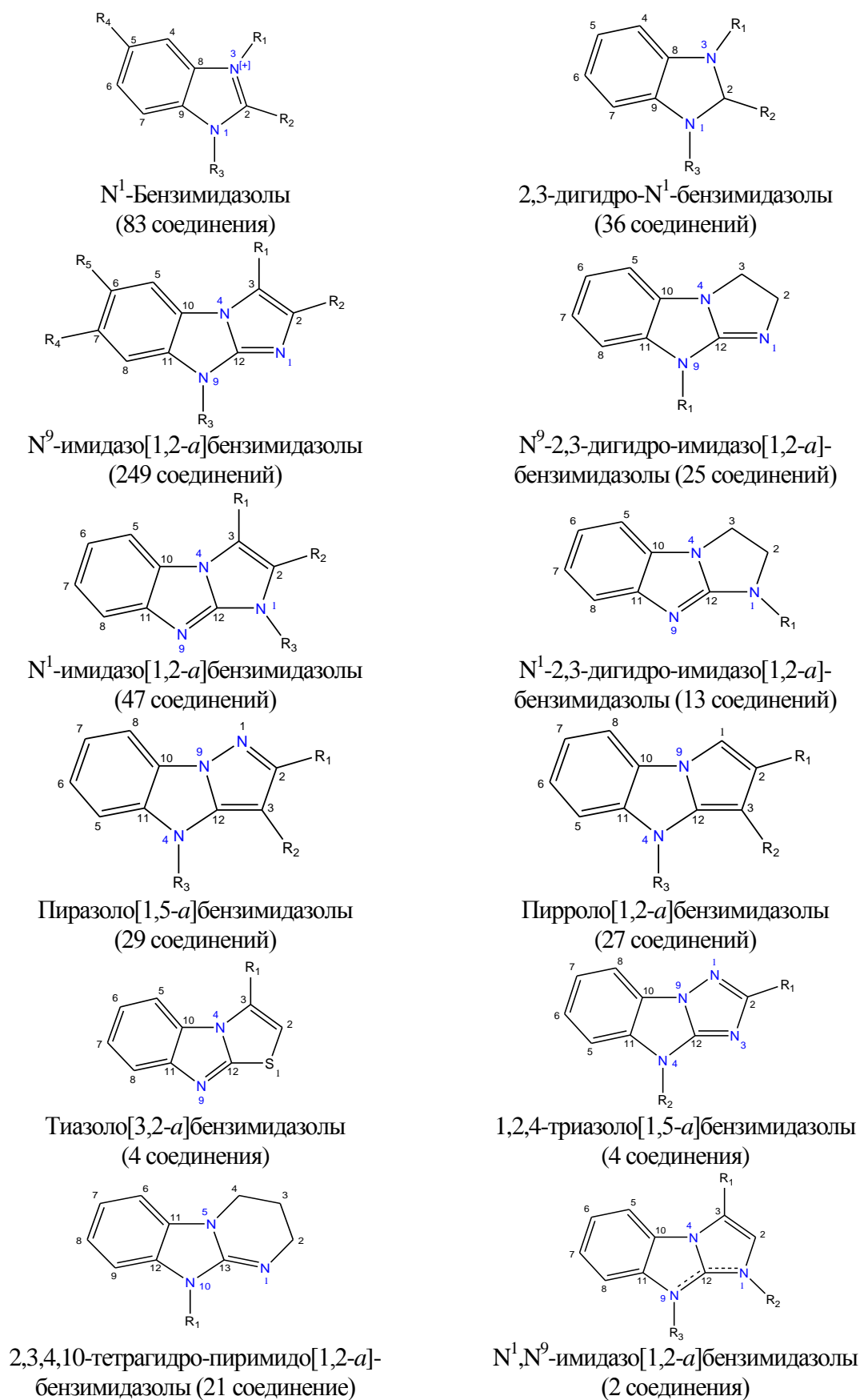
1) различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $N^1$ -бензимидазолы; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолы;  $N^9$ -имидазо-[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо-[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолы; 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы,  $N^1, N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы), представленных на рисунке 2.1.

Все химические соединения были синтезированы к.х.н. В.А. Анисимовой\* (лаборатория органического синтеза НИИ физической и органической химии, Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону). Изученные вещества представляют собой соли и основания с основными неорганическими и с некоторыми органическими кислотами, а также соединения без каких-либо солеобразующих компонентов.

В исследовании были использованы следующие *реактивы*: кальций хлористый 2-х-водный (дигидрат)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), D-глюкоза (безводная) кристаллическая «Ч»  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), натрий хлористый «ХЧ»  $\text{NaCl}$  (ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия), калий хлористый «ЧДА»  $\text{KCl}$  (ООО «РЕАХИМ», Россия), калий фосфорнокислый однозамещенный  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  «ЧДА» (ОАО «Петербургский Красный химик», Россия), магний сернистокислый 7-водный  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ООО «РЕАХИМ», Россия), гидрокарбонат натрия  $\text{NaHCO}_3$  (ООО «РЕАХИМ», Россия), натрия пропионат (MP Biomedicals, Inc., Франция), HEPES (GERBU, Германия), магний хлористый 6-водный «Ч»  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ЗАО «УНИХИМ», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция) синий Эванс (SIGMA, США) и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (SIGMA, США), цАМФ («Sigma», США),  $^3\text{H}$ -цАМФ («Sigma», США); *набор реактивов* для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (сTn-I) фирмы CUSABIO BIOTECH CO.,LTD. (Китай) и *препараты*: амиодарон (Sanofi Aventis, Франция), амринон (SIGMA, США), зонипорид (SIGMA, США), хинидин (SIGMA, США) и этмозин (ФГБУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАН, Россия).

---

\* выражаем благодарность и глубокую признательность к.х.н. В.А. Анисимовой, к.х.н. О.Н. Жуковской, к.х.н. Т.А. Кузьменко за предоставленные субстанции.



**Рис. 2.1. Основные классы конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, производные которых использованы для поиска веществ, проявляющих кардиопротекторную активность (пунктирная связь обозначает возможное наличие двойной связи)**

Исследования проводили на 504 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г, 15 кроликах-самцах массой 2,5-3,5 кг, содержащихся в условиях вивария (температура 22-24°C) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92) [1993]. На момент проведения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования.

Исследование проводили в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правилами лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Все эксперименты были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года).

#### Методы экспериментального изучения фармакологической активности

Экспериментальный поиск соединений, влияющих на **рефрактерность миокарда (увеличивающих продолжительность рефрактерного периода)**, проводили *in vitro* и оценивали по усвоению навязанного ритма изолированными предсердиями крыс [Зайдлер, 1967]. Изолированные предсердия помещали в питательный раствор Кребса (состав в мМ: NaCl 118,0; KCl 4,70; CaCl<sub>2</sub> 2,52; MgSO<sub>4</sub> 1,64; NaHCO<sub>3</sub> 24,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; глюкоза 5,55) при температуре 24°C при постоянной оксигенации. Регистрацию фармакологического ответа проводили с помощью изотонического датчика 7006 при диастолической нагрузке 0,5 г и самописца Unirecord (установка для работы на изолированных органах *Ugo Basile*, Италия). Эффект 167 соединений (список представлен в приложении 1) изучали в диапазоне концентраций  $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-3}$  М. Об активности веществ судили по минимальной эффективной концентрации (МЭК, в М), препятствующей навязыванию ритма (3 Гц; длительность импульса 0,5 мс; напряжение тока, в 2 раза превышающее пороговую величину; электростимулятор ЭСЛ-2, Россия) в течение 15 секунд. В качестве препаратов сравнения использовали известные антиаритмические препараты с разным механизмом влияния на продолжительность эффективного рефрактерного периода - хинидин, амиодарон и этмозин. Опыты

проводили на изолированных предсердиях белых беспородных крыс (n=300) обоего пола массой 180-230 г (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН, ветеринарное свидетельство 247 № 0080153 от 28.11.2012).

Влияние на трансмембранные ионные токи\* изучали на изолированных трабекулах предсердий лягушки *Rana Ridibunda* (диаметром 150 мкм, длина 5-6 мм) при температуре 20-22<sup>0</sup>С. Препараты помещали в систему с двойным сахарозным мостиком [Поротиков, 1982, 2008, Анисимова, 2009], которая позволяла делать измерения с фиксацией тока и напряжения. Мембранотропное действие амфедазола исследовано в диапазоне концентраций:  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Стимуляцию препарата по заданным программам, регистрацию потенциала действия и ионных токов, а также вычисление параметров потенциала действия, порога возбуждения, вольт-амперных и других характеристик ионных каналов, вывод данных проводили в автоматизированном режиме с помощью компьютерных технологий.

Для поиска веществ, обладающих блокирующей активностью в отношении NHE обменника, был использован метод *in vitro* на тромбоцитах кролика [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002]. Активацию NHE-обменника проводили буферным раствором, содержащим пропионат натрия (600 мкл, в ммоль/л: Na пропионат 135, HEPES 20, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, глюкоза 10; pH 6.7; t=37<sup>0</sup>С). Для контроля изменения светопропускания в условиях нормальной pH использовали раствор Кребса (600 мкл, pH 7,4; t=37<sup>0</sup>С). Изменения формы тромбоцитов регистрировали по светопропусканию с помощью лазерного агрегометра «БИОЛА-220 ЛА», Россия (программное обеспечение AGGR версия 2.00, Россия). Исследования 59 соединений (список представлен в приложении 1) проводили в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-6}$  М. В качестве препарата сравнения использовали селективный ингибитор NHE-1 зонипорид. Для наиболее активных соединений рассчитывали IC<sub>50</sub> – концентрацию (в М) соединения, блокирующую NHE-обменник тромбоцитов кролика на 50%. В экспериментах были использованы кролики-самцы (n=15) весом 2,5-3,5 кг (Филиал «Электрогорский» ФГБУ НЦБМТ РАМН, ветеринарное свидетельство 250 № 0380791 от 14.01.2013).

---

\* Исследования были проведены в лаборатории биовозбудимых мембран НИИ по БИХС Россия под руководством д.б.н. В.И.Поротикова, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.



Комплексное изучение **противоишемических свойств** ингибиторов NHE в условиях *in vivo* проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств [Чичканов, 2012]. Эффект соединений оценивали по подъему сегмента ST, размеру зоны некроза и маркеру ишемического повреждения миокарда - тропонину I.

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самках (n=44) весом 260-300 г (ООО «Питомник РАМТН», ветеринарное свидетельство 250 № 0453089 от 16.03.2013). Животные были разделены на 4 группы: 1 - «ложнооперированные»; 2 – «ишемия/реперфузия» - животным с перевязкой общего ствола левой коронарной артерии вводили физиологический раствор за 10 минут до реперфузии; 3-4 – «ишемия/реперфузия+соединение» - животным с перевязкой левой коронарной артерии внутривенно вводили соединения РУ-1355 и препарат сравнения зонипорид в эквимольных дозах 1,12 и 1 мг/кг, соответственно, за 10 минут до реперфузии.

Эксперименты выполнены по стандартной методике в условиях наркоза (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии. Ишемию миокарда моделировали путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА) в течение 60 минут с последующей 60 минутной реперфузией. Визуализацию границ зон риска и зон некроза проводили методом двойного окрашивания синим Эвансом (СЭ) и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТФТ) [Сыренский, 2008]. Поперечные срезы левого желудочка готовили с помощью матрицы Alto, США. Базальные поверхности фотографировали цифровым фотоаппаратом Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels (Япония), расчет площадей осуществляли на компьютере с помощью графического редактора для обработки и анализа изображений программы Image J, США (imagej.ru). Данные по размерам зон риска и инфаркта представляли в виде отношения объема зоны риска к общему объему сердца, а также в виде отношения объема зоны некроза к объему зоны риска (в процентах).

Регистрацию ЭКГ производили на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия; программное обеспечение «Поли-Спектр» с подключенным программным модулем «Поли-Спектр-Анализ/В» (Россия)) во II

стандартном отведении.

В качестве специфического маркера повреждения миокарда [Морозова, 2006; Островский, 2009а,б, 2013] определяли содержание тропонина I в плазме крови (пкг/мл) крыс иммунохимически набором реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (сTn-I) фирмы CUSABIO BIOTECH CO.,LTD. (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США).

Изучение **влияния на фосфодиэстеразу\*** кардиомиоцитов проводили *in vitro* по методу [Kincaid, 1981]. Уровень антиферментной активности характеризовался двумя показателями:  $\Delta(10^{-4})$  – процент ингибирования ФДЭ без добавления кальмодулина;  $\Delta_c(10^{-4})$  – процент ингибирования ФДЭ в присутствии кальмодулина. В обоих случаях концентрация исследуемых 73 веществ (список представлен в приложении 1) составляла  $1 \cdot 10^{-4}$ М [Ларионов, 1988].

Исследование влияния соединений на **сократительную активность** проводили на изолированных предсердиях крыс *in vitro* в соответствие с методическими рекомендациями по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств [Тюренков, 2012]. Изолированные предсердия помещали в питательный раствор Кребса при температуре 24°C при постоянной оксигенации. Силу сокращения и напряжение покоя, развиваемые каждым препаратом после усиления и дифференцирования регистрировали с помощью механоэлектрического преобразователя силы – изометрического датчика на быстродействующем самопишущем приборе Unirecord (установка для изолированных органов (UGO BASILE, (Италия)). Изолированные предсердия стимулировали прямоугольными импульсами длительностью 3-5 мсек, частотой 3 Гц и амплитудой, на 10-20% превышающей пороговую (электростимулятор «ЭС-50-1», Россия). Эффекты испытуемых 16 соединений (список представлен в таблице 2.14 ) были изучены в диапазоне концентрации ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$ М). Рассчитывали  $IC_{50}$  – концентрацию соединения,

---

\* исследования выполнены в лаборатории метаболизма сердца НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН д. м. н. Н. П. Ларионовым, к. м. н. И. А. Феоктистовым, Е.Б. Червяковым за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

увеличивающую амплитуду сокращения изолированных предсердий на 50%. В качестве препарата сравнения был использован негликозидный кардиотонический препарат амрион. Эксперименты были выполнены на 160 белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г (ООО «Питомник РАМН», ветеринарное свидетельство 250 № 0452325 от 22.01.2013).

Проводился расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $M$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ). Расчет величины  $IC_{50}$  выполнен с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excel (пакет Office XP, Microsoft, США).

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Проверку выборки на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили непараметрическим парным тестом Вилкоксона. Сравнение двух независимых выборок проводили с использованием непараметрического парного теста (U-критерий Манна–Уитни). Сравнение трех и более независимых выборок проводили параметрическими (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна) и непараметрическими (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна) методами. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

#### Методы компьютерной обработкой информации.

Теоретическое обоснование перспективности изучения кардиопротекторных свойств различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов как химических ядер для поиска высокоактивных веществ проводили в программах PASS [Филимонов, 2006] и Микрокосм [Васильев, 2005, 2009, 2011, 2012].

По базе данных, состоящей из 205873 известных биологически активных соединений, система PASS позволяет по структурным формулам веществ оценивать наличие/отсутствие у прогнозируемых соединений 3750 видов биологической активности [Филимонов, 2006]. Химическую структуру описывают с помощью двухуровневых атом-центрированных MNA-дескрипторов окружения. Метод прогноза основан на оценке условной вероятности с помощью арксинусного преобразования

Фишера. При прогнозе рассчитывали вероятности  $P_a$  и  $P_i$  принадлежности прогнозируемого вещества к классам соединений, проявляющих и не проявляющих заданную активность; соединение считается активным, если  $P_a > P_i$ .

Из всех видов биологической активности базы данных PASS для прогноза кардиопротекторного эффекта соединений были отобраны 19 релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию (см. приложение 2). Расчеты выполнены с помощью программы PASS Professional Extended 2010 (версия SAR-базы 2012 г.)<sup>\*</sup>, разработанной в НИИ БМХ РАМН (Москва).

**Информационная технология (ИТ) «Микрокосм»** позволяет по структурной формуле соединения прогнозировать для него не только наличие или отсутствие, но и уровень заданных видов фармакологической активности по специально для этого сформированным базам данных [Васильев, 2006, 2009, 2012]. Расчеты выполнены с помощью оригинального программного комплекса ИТ «Микрокосм» (ВолГМУ, версия 5.2, 2012 г.).

При прогнозе в ИТ Микрокосм **методом сходства к эталонам** использовали программу TestSim (версия февраль 2012), которая рассчитывает средний коэффициент сходства Танимото по 11 уровням описания языка QL, который является основным рабочим языком в ИТ Микрокосм.

Прогноз перспективности изучения кардиопротекторных свойств различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов в ИТ «Микрокосм» был выполнен с использованием баз данных по структуре известных лекарственных и биологически активных веществ. В качестве препаратов-стандартов были выбраны: для антиаритмической (n=15) - метопролол, пропранолол, E-4031, соталол, амиодарон, флекаинид, пропафенон, прокаинамид, хинидин, лидокаин, бретилия тозилат, нибентан, афобазол, морицизин, верапамил; для NHE-ингибирующей (n=7) - амилорид, карипорид, зонипорид, энипорид, сабипорид, CHEMBL371454, KR-32568; для антифосфодиэстеразой (n=12) - амринон, милринон, адибендан, пимобендан,

---

<sup>\*</sup> Программа PASS Professional Extended 2010 любезно предоставлена заведующим лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств ГУ НИИ БМХ РАМН им. В. Н. Ореховича, д. б. н., к. ф.-м. н., проф. В. В. Поройковым и главным научным сотрудником этой же лаборатории, к. ф.-м. н. Д. А. Филимоновым.

сульмазол, теофиллин, анагредид, цилостамид, цилостазол, эноксимон, олпринон, имазодан. Химические структуры взяты из базы данных [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) (дата обращения 06.03.2011) и приведены в приложениях 3-5.

Коэффициент 2D-сходства Танимото [Molecular Similarity ..., 1995], рассчитывали по классическим химическим структурным формулам\*. В структуре двух сравниваемых соединений выявляли подструктурные фрагменты, соответствующие функциональным группам, кратным связям, гетероатомам, циклическим системам, с учетом их электронного состояния.

Для оценки степени общего структурного сходства прогнозируемого соединения к референсным препаратам рассчитывали средние коэффициенты сходства Танимото каждого из соединений-стандартов к остальным эталонным веществам. По этому ряду средних значений вычисляли три реперные точки: минимальное значение, общее среднее и максимальное значение. Если величина среднего коэффициента сходства для нового соединения меньше минимального репера, то индекс возможного наличия активности (SI) принимали равным SI=0; если больше минимального, но не выше среднего репера – SI=1; если между общим средним и максимальным – SI=2; если выше максимального – SI=3.

**Прогноз по нормальной стратегии *in silico*** высокой антиаритмической активности среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов выполнен по структуре и активности оригинальных производных азотсодержащих гетероциклов, эффективно влияющих на рефрактерность миокарда, испытанных в научных подразделениях ВолгГМУ. Детальная информация о формировании указанных баз данных приведена в работе Васильева П.М. (2009).

Для выявления **QSAR-закономерностей между биологической активностью и**

---

\* Коэффициент сходства Танимото вычисляли по формуле:

$$SC_{2D} = \frac{N_1 \cap N_2}{N_1 \cup N_2},$$

где  $N_1$  – число подструктурных фрагментов, присутствующих в соединении 1;

$N_2$  – число подструктурных фрагментов, присутствующих в соединении 2;

$N_1 \cap N_2$  – число подструктурных фрагментов, одновременно присутствующих как в соединении 1, так и в соединении 2;

$N_1 \cup N_2$  – число подструктурных фрагментов, присутствующих либо в соединении 1, либо в соединении 2.

химической структурой производных бензимидазола был также использован метод подструктурного анализа [Васильев, 2009, 2014], основанный на статистическом подходе в теории распознавания образов [Горелик, 1984]. Оценка статистической значимости признаков проводилась по стандартной схеме\*.

Все соединения были разделены на классы по уровням активности методом кластерного анализа - наиболее адекватным способом деления неоднородных данных на классы. **Кластерный анализ** проводился вероятностным методом гистограмм и геометрическим методом расстояний [Мандель, 1988]. В методе гистограмм по значениям активности (рисунки 2.4., приложение 11А.) формировали несколько гистограмм с разным числом интервалов, и выбирали ту, на которой классы разделялись наиболее контрастно. В методе расстояний (рисунки 2.4., приложение 11Б) для упорядоченного ряда величин

\* Подсчитывали общее число признака  $i$  в классе активности  $h$  (высокоактивные) и  $nh$  (невысокоактивные):

$$K_{ih,nh} = \frac{N_{h,nh}}{\sum_{j=1} K_{ij}}, \quad i=1 \dots M,$$

где  $N_{h,nh}$  – число соединений в классе  $h$  или  $nh$ ;  $K_{ij}$  – число признака вида  $i$  в соединении  $j$ ;  $M$  – число видов признаков.

Для каждого из  $M$  признаков подсчитывали число его выполнений в каждом из двух классов, деленное на вес класса, т.е. находили исправленное на размер класса общее число признака  $i$  в классе  $h$  и  $nh$ :

$$S_{ih,nh} = \frac{K_{ih,nh}}{N_{h,nh}} \times \frac{(N_h + N_{nh})}{2}, \quad i=1 \dots M.$$

Вычисляли Байесовскую вероятность встречаемости признака  $i$  в классе  $h$  и  $nh$  [Голендер, 1978]:

$$P_{ih,nh} = \frac{S_{ih,nh} + 1}{S_{ih} + S_{inh} + 2}, \quad i=1 \dots M.$$

Различия в частоте встречаемости признака  $i$  в классах  $h$  и  $nh$  определяли по биномиальному критерию [Глотов, 1982]:

$$Z_i = \frac{\left| P_{ih} - P_{inh} \right| - \frac{1}{4 \times (S_{ih} + S_{inh})}}{\sqrt{\frac{0,5}{(S_{ih} + S_{inh})}}}, \quad i=1 \dots M.$$

По величине биномиального критерия определяли значимость влияния признака  $i$  на наличие или отсутствие высокой антиагрегантной активности:

$$Pr_i = 1 - N(Z_i),$$

где  $N$  – функция стандартного нормального распределения с параметрами (0,1).

В зависимости от значения  $Pr$  определяли степень влияния в виде индекса значимости: Ind = 0 балл – влияние отсутствует ( $Pr \geq 0,2$ ); Ind = 1 балл – тенденция ( $0,1 < Pr < 0,2$ ); Ind = 2 балла – слабое ( $0,05 < Pr < 0,1$ ); Ind = 3 балла выраженное, статистически значимое ( $0,01 < Pr < 0,05$ ); Ind = 4 балла сильное ( $0,001 < Pr < 0,01$ ); Ind = 5 баллов очень сильное ( $Pr < 0,001$ ).

При условии, что  $P_{ih} > P_{inh}$  и  $Pr_i < 0,05$ , признак  $i$  считали детерминирующим высокую активность признаком. Если  $P_{inh} > P_{ih}$  и  $Pr_i < 0,05$ , то признак  $i$  определяет отсутствие у соединения выраженных свойств.

активности производили построение графика значений разностей между парами соседних точек; максимумы на нем соответствовали границам классов. Итоговые границы классов определяли как средние от величин, полученных двумя методами кластеризации.

Для выявления влияния типа конденсированного ядра на уровень высокой активности в качестве признаков использовали сам тип базовой структуры. А при исследовании влияния типа заместителей на уровень активности внутри каждого из классов в качестве признаков были приняты типы заместителей в положении  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ .

Кроме подструктурного анализа прогноз перспективности базовых структур антифибрилляторной, противоишемической, кардиотонической активности проводили с использованием медианных и супремальных оценок уровня активности.

В соответствии с моделью Фри-Уилсона [Голендер, 1978], общая (итоговая) биологическая активность соединения формируется из вклада ядра и отдельно присоединенных к этой структуре заместителей. При этом вклад базовой структуры в общую биологическую активность соединения оценивается как среднее арифметическое всех значений фармакологической активности исследуемых веществ:

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i \text{ где } N - \text{число соединений в классе; } X_i - \text{значение активности } i\text{-го соединения.}$$

Лабильность базовой структуры в отношении введения в него заместителей, усиливающих или ослабляющих активность соединения, определяет дисперсию (степень разброса) фармакологической активности в ряду исследуемых веществ. В качестве меры отклика базовой структуры на введение в нее заместителей может выступать любая вариационная характеристика, например, максимальное значение – одна из наиболее известных супремальных метрик. Эта оценка, отражающая предельные значения фармакологической активности производных данного химического класса, при увеличении объема выборки асимптотически приближается к супремуму функции, описывающей зависимость «структура – активность».

$$\sup (X) = \max_{i=1}^N (X_i); \text{ где } N - \text{число соединений в классе; } X_i - \text{значение активности } i\text{-го соединения.}$$

Одним из непараметрических подходов к обработке данных, полученных в разных условиях, является метод средних ранговых оценок. Классически ранг определяется как

номер наблюдения в упорядоченном ряду. Множество ранговых значений есть множество целых чисел, оно всегда имеет один и тот же масштаб и не зависит от характера ранжируемых данных. Оценку инотропной активности соединений рассчитывали как средний ранг трех экспериментальных показателей: уровня активности ФДЭ без и в присутствии кальмодулина, а также уровень сократительной активности изолированных предсердий.

Подструктурный анализ, среднее, супремальное и ранговое оценивание уровня активности проводили в программе Excel 2007 (*MS Office XP*, США), с использованием дополнительного пакета анализа данных. При анализе химических структур и конструировании скаффолдов использовались стандартные средства обработки химической информации (*ChemDraw StandAlone 2004*).

Построение потенциальных 2D-фармакофоров проводили с помощью модуля FarmFor (версия 2006 г.) ИТ «Микрокосм» 5.2 (версия 2012) по матрице QL-дескрипторов, содержащей информацию о числе дескрипторов различного вида и типа в структуре каждого активного или неактивного соединения данной обучающей выборки по следующей оригинальной методике [Спасов, 2007; Васильев, 2013]. Информационная технология «Микрокосм» позволяет формировать потенциальные фармакофоры путем объединения в одной общей формуле множество дескрипторов, представляющих собой фиксированные фрагменты химической структуры [Васильев, 2006].

Согласно определению понятия IUPAC, фармакофор - это совокупность пространственных и электронных особенностей, которые необходимы для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий со структурой специфической биологической мишени и приводящих в действие ее биологический отклик. Фармакофор не представляет собой реальную молекулу или реальную совокупность функциональных групп, но является чисто абстрактной концепцией, рассматривающей общие молекулярные способности групп соединений по отношению к структуре мишени [Спасов, 2007].

Одной из форм реализации фармакофорного анализа, по мнению IUPAC, является построение потенциального структурного 2D-фармакофора.

2D-фармакофор представляет собой фрагмент структурной формулы, общий для активных соединений, который содержит несколько фармакофорных групп, соединенных



между собой цепочками связей различной длины.

На первом этапе рассчитывались списки первичных статистически значимых QL-признаков «активности» или «неактивности»<sup>\*</sup>.

На втором этапе проводили окончательное формирование возможных фармакофоров

<sup>\*</sup> Количество всех дескрипторов  $i$ -го типа для классов активных или неактивных веществ

$$S_i^{a,n} = \sum_{j=1}^{d_i} K_{ij}^{a,n}, \quad i=1,\dots,11,$$

где

$i$  – тип QL-дескриптора в матрице,  $i=1,\dots,11$ ;

$j$  – вид дескриптора  $i$ -го типа в матрице,  $j=1,\dots,d_i$ ;

$d_i$  — число видов уникальных дескрипторов  $i$ -го типа в матрице;

$ij$  –  $j$ -й дескриптор  $i$ -го типа;

$a$  – класс активных соединений;

$n$  – класс неактивных соединений;

$K_{ij}^{a,n}$  – количество дескрипторов  $ij$  в матрице для классов  $a$  или  $n$ .

Байесовская частота встречаемости дескриптора  $j$ -го вида  $i$ -го типа в классе  $a$  активных или в классе  $n$  неактивных соединений

$$P_{ij}^{a,n} = \frac{K_{ij}^{a,n} + 1}{S_i^{a,n} + d_i}.$$

Для каждого дескриптора  $j$ -го вида  $i$ -го оценивалась достоверность различия Байесовских частот встречаемости этого дескриптора в классе  $a$  активных и в классе  $n$  неактивных соединений по гипергеометрическому критерию [Корн, 1973]:

$$Pr_{ij} = \frac{\left( \frac{(K_{ij}^a + K_{ij}^n + 2)}{(K_{ij}^a + 1)} \right) \times \left( \frac{(S_i^a + S_i^n + 2d_i) - (K_{ij}^a + K_{ij}^n + 2)}{(S_i^a + d_i) - (K_{ij}^a + 1)} \right)}{\left( \frac{(S_i^a + S_i^n + 2d_i)}{(S_i^a + d_i)} \right)}.$$

QL-дескриптор  $j$ -го вида  $i$ -го типа является статистически значимым признаком «активности», если

$$P_{ij}^a \geq P_{ij}^n \quad \text{и} \quad Pr_{ij} \leq Pr_0,$$

где  $Pr_0$  – адаптивный порог значимости, выбираемый таким образом, чтобы число значимых признаков не превышало 200, при этом  $Pr_0$  не может превышать 0,01 (с целью получения высокодостоверных признаков).

Аналогично,  $j$ -й дескриптор  $i$ -го типа является статистически значимым признаком «неактивности», если

$$P_{ij}^a < P_{ij}^n \quad \text{и} \quad Pr_{ij} \leq Pr_0.$$

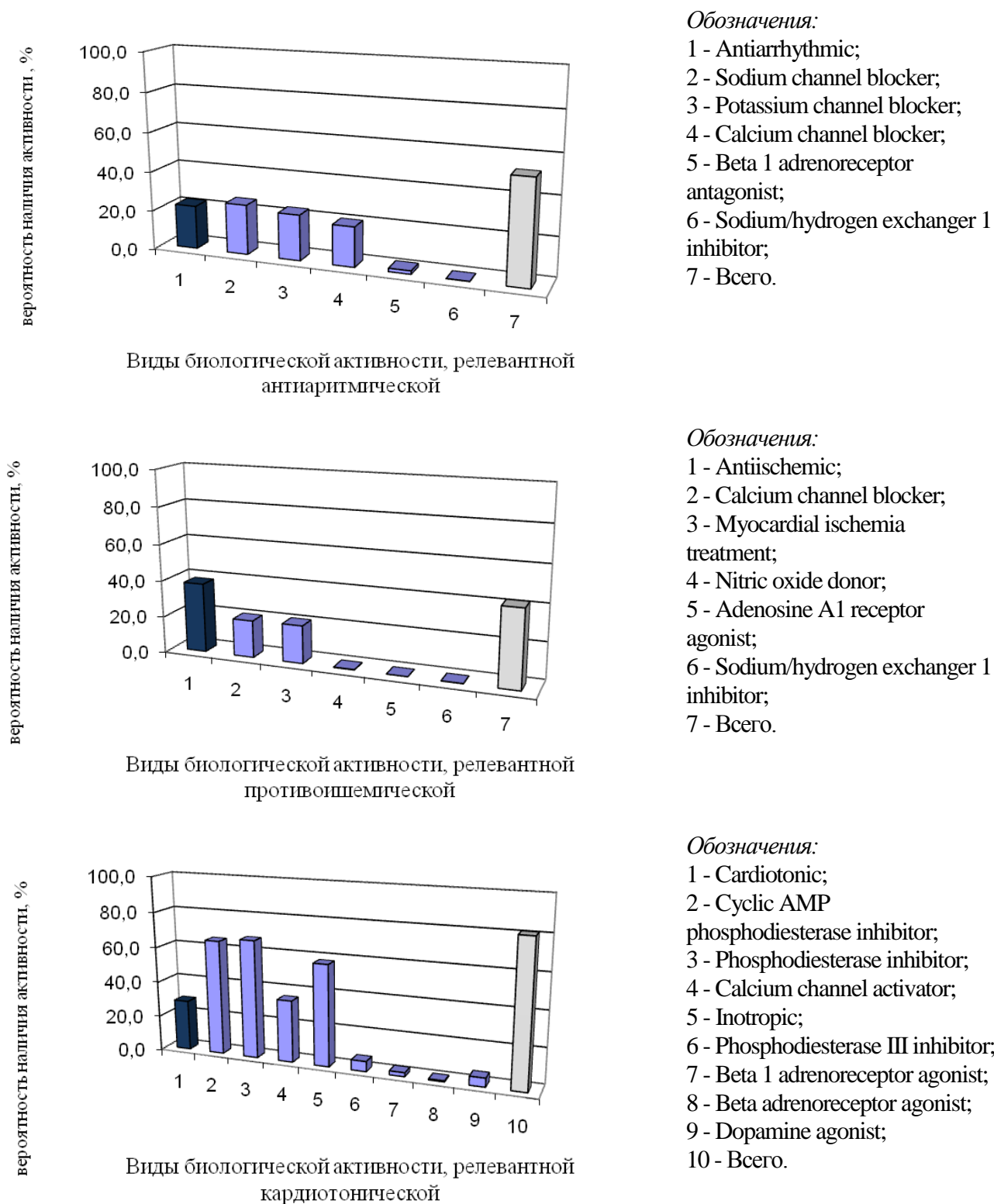
по рассчитанным спискам первичных статистически значимых QL-признаков.

Путем попарного сравнения всех признаков в списке выявляли пары QL-дескрипторов, имеющие совпадающие или структурно близкие особенности. Полученные пары признаков объединялись в промежуточные «интегральные» признаки, которые сравнивали между собой и с оставшимися в списке первичными QL-признаками, найденные пары-аналоги опять объединяли. Процедуру повторяли до полного исчерпания возможностей попарного объединения признаков – как первичных, так и промежуточных.

## **2.2. ОБОСНОВАНИЕ *IN SILICO* ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ**

Результаты прогноза кардиопротекторной активности в системе PASS для 19 видов биологической активности, релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию для класса производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (1393 структур) представлены в приложении 2 и на рисунке 2.2.

При оценке как собственно антиаритмической активности, так и наиболее характерных для истинных антиаритмиков механизмов активности (блокада натриевых, калиевых и кальциевых каналов) было показано, что они одинаково характерны для производных бензимидазолов из проанализированных 1393 соединений. Вероятность проявления у них каждого из данных видов активности составила в среднем 23%. При объединении всех веществ, проявляющих хотя бы один из видов активностей, релевантных антиаритмической, таких соединений оказалось 52,5% (731 из 1393).



**Рис 2.2. Результаты прогноза в PASS видов биологической активности, релевантных кардиопротекторной для производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (1393 структур; названия активностей соответствуют списку PASS).**

Собственно противоишемическая активность была характерна примерно для 38% всех соединений и несколько меньше блокада кальциевых каналов (20,4%). Всего различными видами активностей, участвующими в формировании противоишемического действия, должны обладать примерно 42,1% соединений (587 из 1393). Хотя собственно кардиотоническая оказалась характерна для 28,5% соединений, сцепленные с ней активности (способность ингибировать ФДЭ, инотропное действие, активация кальциевых каналов и др.) прогнозируются на уровне от 35 до 67,1%. Общий прогноз для всех активностей, релевантных кардиотонической, составил 80,8% (1126 из 1393).

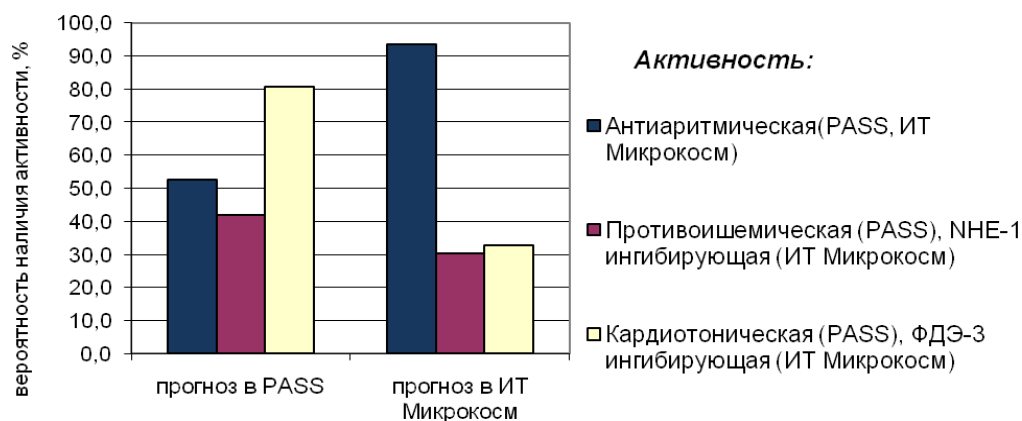
При сравнении интегральных показателей в PASS перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на наличие кардиопротекторной активности показано, что наиболее характерны для ряда в 1393 соединений кардиотоническая>антиаритмическая> противоишемическая.

Однако, по новым наиболее перспективным в настоящее время механизмам действия в системе PASS прогноз оказался незначительным, а некоторых активностей не оказалось вообще. Так для NHE-1-ингибирующей активности он составил 0,1%, ФДЭ-3-ингибирующей активности 5,7%. Вероятно это связано с недостаточными разработанностью данных направлений и поиска соединений с подобными свойствами.

На следующем этапе был проведен прогноз уровня фармакологической активности в ИТ «Микрокосм» методом сходства к эталонам, с расчетом модифицированного коэффициента сходства по Танимото. При выборе эталонов из каждого вида активности, релевантного кардиопротекторной, взяты по одному наиболее перспективному механизму действия: для антиаритмиков в основном блокаторы трансмембранных ионных токов, для противоишемических - блокаторы NHE-1, для кардиотонических - ингибиторы ФДЭ-3 кардиомиоцитов. В приложениях 6-8 «Взаимное сходство соединений-стандартов референсных...» по каждому виду активности приведены коэффициенты сходства каждого из стандартов к остальным эталонам, а в последней строке «Средние» – средний коэффициент сходства каждого репера к остальным референсным соединениям (кроме себя). В соответствии с этим, вычислив коэффициент сходства всех 1393 производных конденсированных и

неконденсированных бензимидазолов к референсным препаратам и упорядочив их в порядке убывания общего коэффициента сходства, мы получили, что ни для одного вида активности (антиаритмической, NHE-1-ингибирующей, ФДЭ-3-ингибирующей) не было спрогнозировано ни одного соединения с высокой вероятностью наличия эффекта (сходство выше максимального референсного, индекс сходства SI=3 балла).

При оценке прогноза антиаритмического действия 1302 соединений, вероятно, будут иметь умеренный эффект (SI=1-2 балла), то есть 93,5% структур достаточно схожи с референсными препаратами и могут проявлять данный вид активности. Прогноз NHE-1-ингибирующей активности показал, что умеренный эффект (SI=1-2 балла) могут иметь 422 соединения (30,3%). При оценке прогноза ингибирующей активности в отношении ФДЭ-3 возможный умеренный эффект (SI =1-2 балла) могут иметь 456 соединений (32,7%). При сравнении интегральных показателей ИТ Микрокосм перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на наличие кардиопротекторного действия обнаружено, что наиболее характерны антиаритмическая >ФДЭ-3-ингибирующая ≥ NHE-1-ингибирующая активности (рис. 2.3).



**Рис. 2.3. Консенсусный прогноз перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов как источников веществ с кардиопротекторной активностью.**

Таким образом, при объединении выбранных нами кардиотропных активностей показано, что класс производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов является перспективным для проведения экспериментального поиска кардиопротекторов.

## 2.3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

### 2.3.1. Подструктурный анализ влияния типа базовой структуры изучаемых соединений на уровень антиаритмической активности (данные ретроспективного и расширенного подструктурных анализов)

Ранее для оценки зависимости кардиопротекторного действия производных бензимидазола от структуры и физико-химических свойств использовали эмпирический подход, основанный на логических рассуждениях и статистическом анализе, который позволял выявить только ряд закономерностей. В частности при изучении производных ИмБИ выявлена взаимосвязь между фармакологической активностью и физико-химическими показателями: вычисленными величинами липофильности, электроностерического параметра молекулярной рефракции и стерического параметра Аустела заместителей молекулы для антиаритмической активности. Анализ математической зависимости структура-активность в ряду производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола позволил заключить, что величина молекулярной рефракции заместителя при втором атоме углерода лимитирует действие веществ на рефрактерный период миокарда. Интегрирование уравнения данной количественной зависимости показало, что производные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола при наличии заместителей в положении C<sup>2</sup>, C<sup>3</sup>, N<sup>9</sup> могут удлинять рефрактерный период в концентрации до  $1 \times 10^{-7}$  М (максимально возможная активность) [Спасов, 1984]. Вместе с тем, проведенный таким образом анализ нуждался в дальнейшей детализации с использованием математических методов и современных компьютерных технологий для оценки роли отдельных структурных дескрипторов.

Поэтому на первом этапе в наших исследованиях проведен ретроспективный подструктурный анализ влияния типа базовой структуры (ядра, "кóра") на рефрактерность миокарда (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) предсердий крыс (антиаритмическая активность) 301 ранее изученного соединения [Спасов, 1984] различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (N<sup>1</sup>-бензимидазолы; 2,3-дигидро-N<sup>1</sup>-бензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо-[1,2-*a*]-

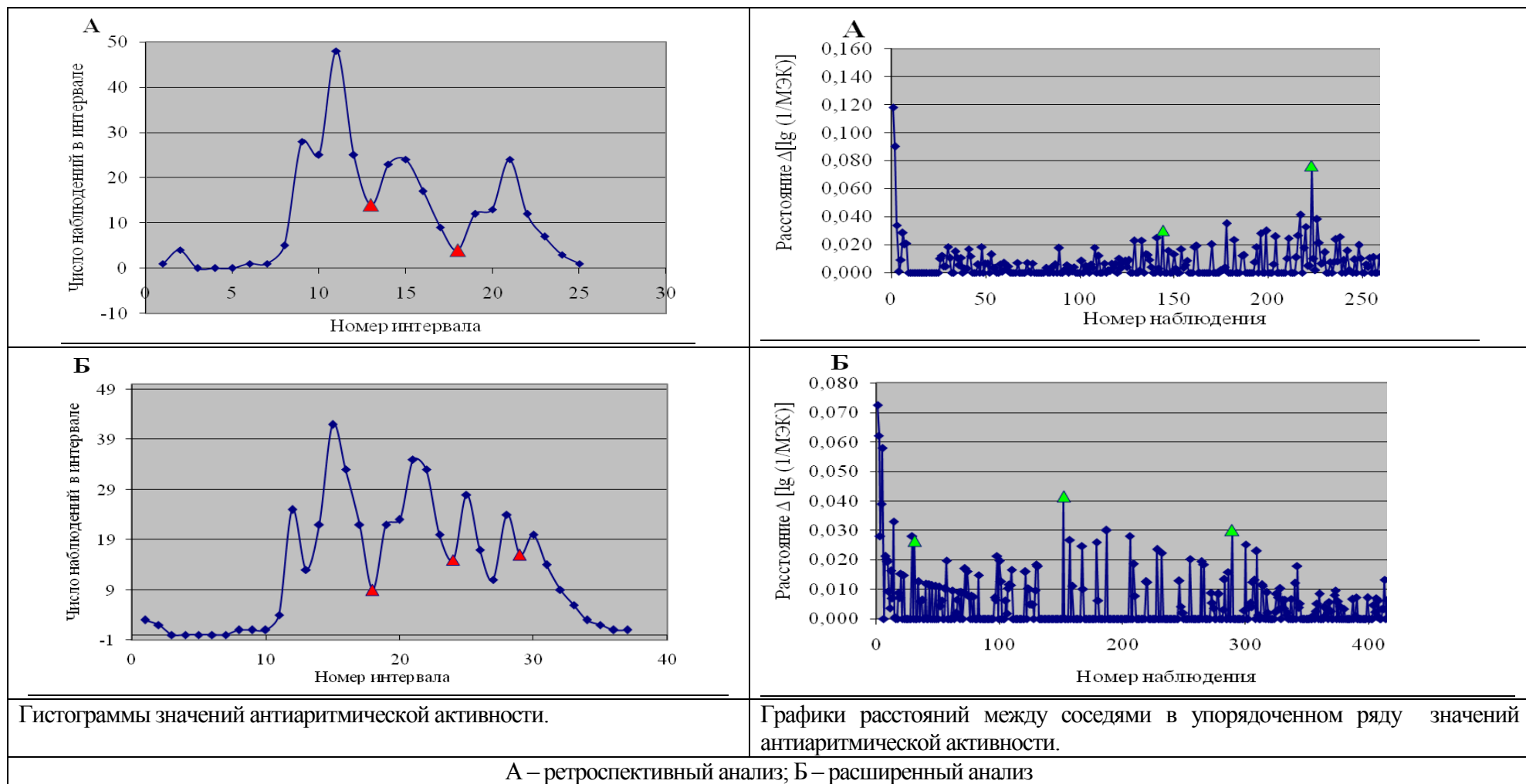
бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо-[1,2-*a*]-бензимидазолы; N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]-бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы).

Для проведения ретроспективного подструктурного анализа все соединения были разделены на классы с различными уровнями активности. Эти соединения и данные об их активности представлены в приложении 1. В результате кластерного анализа данных (рис. 2.4А) были выявлены следующие классы соединений: «высокоактивные» – «high»: МЭК < 7,25\*10<sup>-5</sup> М; умеренноактивные – «moderate»: 7,25\*10<sup>-5</sup> ≤ МЭК < 2,79\*10<sup>-4</sup> М; низкоактивные – «low»: МЭК ≥ 2,79\*10<sup>-4</sup> М.

Результаты подструктурного анализа влияния типа ядра производных бензимидазола на высокий уровень антиаритмической активности приведены в табл. 2.1 и на рис. 2.5. Было показано, что производные класса N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых антиаритмических соединений: индексы значимости +5,0 и +3,0 соответственно.

Выраженное отрицательное значение индекса свидетельствует о статистически значимом отрицательном влиянии на высокий уровень данного вида активности. Так, у химической группы производных N<sup>1</sup>-бензимидазола, пиролло[1,2-*a*]бензимидазола, 2,3-дигидро-N<sup>1</sup>-бензимидазола, N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола он составил -5,0; -5,0; -4,0 и -3,0 соответственно.

Для определения перспективности производных N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола требуются более детальные исследования. Поскольку индекс значимости «0» для этих химических классов свидетельствует о наличии равного количества как высокоактивных, так и низкоактивных соединений и вероятном отсутствии существенного влияния базовой структуры на «высокий» уровень активности. В этом случае детерминирующее значение могут иметь типы присоединенных к этой структуре заместителей.



**Рис. 2.4. Определение методом кластерного анализа границ классов антиаритмической активности *in vitro* среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов.** Ретроспективный анализ: «высокоактивные» – «high»:  $MЭК < 7,25 \cdot 10^{-5}$  М; умеренноактивные – «moderate»:  $7,25 \cdot 10^{-5} \leq MЭК < 2,79 \cdot 10^{-4}$  М; низкоактивные – «low»:  $MЭК \geq 2,79 \cdot 10^{-4}$  М. Расширенный анализ: «очень высокоактивные» – «veryhigh»:  $MЭК < 3,74 \cdot 10^{-5}$  М; «высокоактивные» – «high»:  $3,74 \cdot 10^{-5} < MЭК < 1,04 \cdot 10^{-4}$  М; «прочие»:  $MЭК > 1,04 \cdot 10^{-4}$  М (т.е. включает умеренноактивные, низкоактивные, неактивные, соединения с противоположным эффектом – «inverse»).

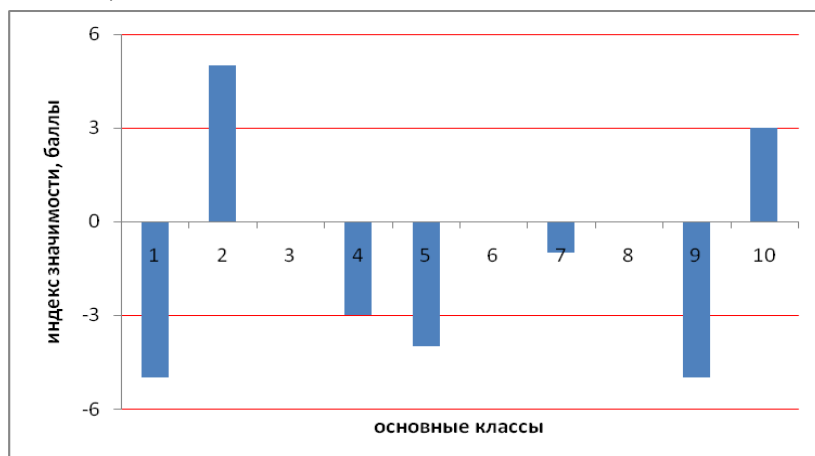


Таблица 2.1

**Ретроспективный\* подструктурный анализ влияния типа ядра на наличие высокой антиаритмической активности† производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов**

№	Химический класс	n	$P_h^{1)}$	$P_{nh}^{2)}$	$Z^{3)}$	$Pr^{4)}$	$Ind^{5)}$
1	N <sup>1</sup> -бензимидазолы	22	0,0608	0,9392	4,953	$3,65 \cdot 10^{-7}$	-5
2	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	174	0,5878	0,4122	3,430	$3,02 \cdot 10^{-4}$	5
3	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	26	0,5368	0,4632	0,497	$3,10 \cdot 10^{-1}$	0
4	N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	6	0,1683	0,8317	2,142	$1,61 \cdot 10^{-2}$	-3
5	2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы	8	0,1378	0,8622	2,629	$4,28 \cdot 10^{-3}$	-4
6	N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	9	0,4805	0,5195	0,073	$4,71 \cdot 10^{-1}$	0
7	Пиримидо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	3	0,2518	0,7482	1,222	$1,11 \cdot 10^{-1}$	-1
8	N <sup>1</sup> ,N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	2	0,3017	0,6983	0,827	$2,04 \cdot 10^{-1}$	0
9	Пирроло[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	27	0,0506	0,9494	5,568	$1,29 \cdot 10^{-8}$	-5
10	N <sup>4</sup> -пиразоло[1,5- <i>a</i> ]бензимидазолы	24	0,6460	0,3540	2,223	$1,31 \cdot 10^{-2}$	3

Примечание: n – число соединений; <sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «высокая»; <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ, не имеющих высокой активности; <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различие значений  $P_h$  и  $P_{nh}$ ; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие высокой активности; <sup>5)</sup> индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).



**Рис. 2.5. Влияние типа базовой структуры на высокий уровень антиаритмической активности (ретроспективный анализ): нумерация столбцов соответствует нумерации химических классов в табл. 2.1**

\* – по данным А.А. Спасова, 1984

† МЭК  $< 7,25 \cdot 10^{-5}$  М

Учитывая полученные результаты ретроспективного анализа влияния базовой структуры производных бензимидазола на высокий уровень антиаритмической активности, на следующем этапе по структуре и активности испытанных оригинальных производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов был проведен виртуальный скрининг в ИТ «Микрокосм» неиспытанных соединений перспективных классов и классов, эффективность которых требовала уточнения. Детальная информация о данном прогнозе приведена в работе Васильева П.М. (2009). В приложении 9 приведен пример прогноза по нормальной стратегии высокой антиаритмической активности среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов.

Был проведен экспериментальный поиск *in vitro* соединений, влияющих на **рефрактерность** (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) **изолированных предсердий крыс** среди 167 неиспытанных **соединений** различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -бензимидазолы; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы) **в отношении которых получен положительный прогноз** высокой антиаритмической активности *in silico*, а так же **вновь синтезированных соединений** классов, перспективных по прогнозу PASS. Информация об этих соединениях и их активности представлены в табл. 2.2 и *жирным курсивом* в приложении 1.

Полученные результаты позволили увеличить выборку данных и провести расширенный подструктурный анализ влияния типа ядра на уровень антиаритмической активности. Повторно была проведена кластеризация и все соединения вновь разделены на классы с различными уровнями активности. В результате кластерного анализа данных (рис. 2.4Б) появился принципиально новый класс активности: «очень высокий» – «veryhigh»:  $МЭК < 3,74 \cdot 10^{-5}$  М. Обращает на себя внимание тот факт, что в данный класс не попадает ни один из изученных на этой модели наиболее известных в настоящее время антиаритмических препаратов. Остальные классы распределились следующим образом: «высокоактивные» – «high»:  $3,74 \cdot 10^{-5} < МЭК < 1,04 \cdot 10^{-4}$  М; «прочие»:  $МЭК > 1,04 \cdot 10^{-4}$  М (включает умеренноактивные, низкоактивные, неактивные,

## Влияние конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на возбудимость изолированных предсердий крыс (МЭК, М)

<b>N<sub>э</sub></b>	<b>Шифр</b>	<b>MЭЖ, М</b>	<b>N<sub>э</sub></b>	<b>Шифр</b>	<b>MЭЖ, М</b>	<b>N<sub>э</sub></b>	<b>Шифр</b>	<b>MЭЖ, М</b>
<b>N<sup>0</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазолы</b>								
1.	RU-703	1,00x10 <sup>-5</sup>	19.	RU-704	6,00x10 <sup>-5</sup>	37.	RU-1285	1,60x10 <sup>-4</sup>
2.	RU-639	3,00x10 <sup>-5</sup>	20.	RU-1201	6,00x10 <sup>-5</sup>	38.	RU-709	1,80x10 <sup>-4</sup>
3.	RU-261	3,50x10 <sup>-5</sup>	21.	RU-1256	6,00x10 <sup>-5</sup>	39.	RU-1288	1,80x10 <sup>-4</sup>
4.	RU-711	4,00x10 <sup>-5</sup>	22.	RU-692	6,10x10 <sup>-5</sup>	40.	RU-1292	1,80x10 <sup>-4</sup>
5.	RU-262	4,30x10 <sup>-5</sup>	23.	RU-1202	6,50x10 <sup>-5</sup>	41.	RU-1197	2,00x10 <sup>-4</sup>
6.	RU-691	4,50x10 <sup>-5</sup>	24.	RU-1325	6,80x10 <sup>-5</sup>	42.	RU-1204	2,00x10 <sup>-4</sup>
7.	RU-18	5,00x10 <sup>-5</sup>	25.	RU-476	7,00x10 <sup>-5</sup>	43.	RU-708	2,50x10 <sup>-4</sup>
8.	RU-712	5,00x10 <sup>-5</sup>	26.	RU-1326	7,10x10 <sup>-5</sup>	44.	RU-1193	2,50x10 <sup>-4</sup>
9.	RU-26	5,50x10 <sup>-5</sup>	27.	RU-279	8,00x10 <sup>-5</sup>	45.	RU-1330	2,70x10 <sup>-4</sup>
10.	RU-1289	5,50x10 <sup>-5</sup>	28.	RU-710	8,00x10 <sup>-5</sup>	46.	RU-1194	3,00x10 <sup>-4</sup>
11.	RU-1291	5,50x10 <sup>-5</sup>	29.	RU-694	8,30x10 <sup>-5</sup>	47.	RU-1205	3,00x10 <sup>-4</sup>
12.	RU-526	5,60x10 <sup>-5</sup>	30.	RU-446	8,90x10 <sup>-5</sup>	48.	RU-1255	3,00x10 <sup>-4</sup>
13.	RU-1286	5,60x10 <sup>-5</sup>	31.	RU-702	9,00x10 <sup>-5</sup>	49.	RU-1327	3,50x10 <sup>-4</sup>
14.	RU-1287	5,60x10 <sup>-5</sup>	32.	RU-451	1,10x10 <sup>-4</sup>	50.	RU-1192	5,00x10 <sup>-4</sup>
15.	RU-216	5,70x10 <sup>-5</sup>	33.	RU-1290	1,10x10 <sup>-4</sup>	51.	RU-1196	5,00x10 <sup>-4</sup>
16.	RU-212	6,00x10 <sup>-5</sup>	34.	RU-272	1,40x10 <sup>-4</sup>	52.	RU-1191	7,00x10 <sup>-4</sup>
17.	RU-473	6,00x10 <sup>-5</sup>	35.	RU-527	1,50x10 <sup>-4</sup>	53.	RU-1257	8,00x10 <sup>-4</sup>
18.	RU-641	6,00x10 <sup>-5</sup>	36.	RU-1331	1,50x10 <sup>-4</sup>			
<b>N<sup>I</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазолы</b>								
1.	RU-1275	1,30x10 <sup>-5</sup>	5.	RU-882	4,30x10 <sup>-5</sup>	9.	RU-1276	5,80x10 <sup>-5</sup>
2.	RU-1274	1,50x10 <sup>-5</sup>	6.	RU-1277	4,50x10 <sup>-5</sup>	10.	RU-1273	1,10x10 <sup>-4</sup>
3.	RU-563	2,00x10 <sup>-5</sup>	7.	RU-880	4,80x10 <sup>-5</sup>	11.	RU-1333	1,20x10 <sup>-4</sup>
4.	RU-879	3,30x10 <sup>-5</sup>	8.	RU-883	5,00x10 <sup>-5</sup>			
<b>N<sup>0</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы</b>								
1.	RU-1309	3,00x10 <sup>-5</sup>	5.	RU-1303	1,50x10 <sup>-4</sup>	9.	RU-892	5,00x10 <sup>-4</sup>
2.	RU-1301	6,00x10 <sup>-5</sup>	6.	RU-1311	1,50x10 <sup>-4</sup>	10.	RU-1299	6,00x10 <sup>-4</sup>
3.	RU-1307	6,00x10 <sup>-5</sup>	7.	RU-1317	1,50x10 <sup>-4</sup>	11.	RU-1316	7,00x10 <sup>-4</sup>
4.	RU-1297	1,00x10 <sup>-4</sup>	8.	RU-1312	2,00x10 <sup>-4</sup>			
<b>N<sup>I</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы</b>								

1.	RU-1207	$6,00 \times 10^{-5}$	3.	RU-1209	$8,00 \times 10^{-5}$	5.	RU-1208	$1,50 \times 10^{-4}$
2.	RU-1206	$8,00 \times 10^{-5}$	4.	RU-1210	$1,00 \times 10^{-4}$	6.	RU-1163	$5,00 \times 10^{-4}$
N <sup>1</sup> -бензимидазолы								
1.	АЖ-27	$3,00 \times 10^{-5}$	18.	АЖ-22	$1,00 \times 10^{-4}$	35.	АЖ-58	$4,00 \times 10^{-4}$
2.	АЖ-72	$3,00 \times 10^{-5}$	19.	АЖ-49	$1,00 \times 10^{-4}$	36.	RU-911	$4,50 \times 10^{-4}$
3.	АЖ-71	$4,00 \times 10^{-5}$	20.	АЖ-55	$1,00 \times 10^{-4}$	37.	АЖ-42	$5,00 \times 10^{-4}$
4.	АЖ-18	$4,50 \times 10^{-5}$	21.	АЖ-70	$1,00 \times 10^{-4}$	38.	АЖ-43	$5,00 \times 10^{-4}$
5.	АЖ-56	$4,50 \times 10^{-5}$	22.	АЖ-20	$1,50 \times 10^{-4}$	39.	АЖ-60	$5,00 \times 10^{-4}$
6.	АЖ-21	$6,00 \times 10^{-5}$	23.	АЖ-25	$1,50 \times 10^{-4}$	40.	АЖ-62	$5,00 \times 10^{-4}$
7.	АЖ-59	$6,00 \times 10^{-5}$	24.	АЖ-47	$1,50 \times 10^{-4}$	41.	АЖ-51	$6,00 \times 10^{-4}$
8.	АЖ-69	$6,00 \times 10^{-5}$	25.	АЖ-54	$1,50 \times 10^{-4}$	42.	АЖ-52	$6,00 \times 10^{-4}$
9.	АЖ-74	$6,00 \times 10^{-5}$	26.	АЖ-63	$1,50 \times 10^{-4}$	43.	АЖ-64	$6,00 \times 10^{-4}$
10.	АЖ-68	$7,00 \times 10^{-5}$	27.	РУ-1355	$1,80 \times 10^{-4}$	44.	АЖ-50	$7,00 \times 10^{-4}$
11.	АЖ-17	$8,00 \times 10^{-5}$	28.	АЖ-41	$2,00 \times 10^{-4}$	45.	АЖ-65	$8,00 \times 10^{-4}$
12.	АЖ-23	$8,00 \times 10^{-5}$	29.	АЖ-45	$2,00 \times 10^{-4}$	46.	RU-910	>0.001
13.	АЖ-26	$8,00 \times 10^{-5}$	30.	АЖ-61	$2,00 \times 10^{-4}$	47.	RU-912	>0.001
14.	АЖ-46	$8,00 \times 10^{-5}$	31.	АЖ-19	$2,60 \times 10^{-4}$	48.	RU-913	>0.001
15.	АЖ-53	$8,00 \times 10^{-5}$	32.	АЖ-16	$3,00 \times 10^{-4}$	49.	АЖ-44	>0.001
16.	АЖ-73	$8,00 \times 10^{-5}$	33.	АЖ-24	$4,00 \times 10^{-4}$	50.	АЖ-66	>0.001
17.	АЖ-48	$8,50 \times 10^{-5}$	34.	АЖ-57	$4,00 \times 10^{-4}$	51.	АЖ-67	>0.001
2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы								
1.	RU-137	$4,70 \times 10^{-5}$	8.	АЦИ-18	$1,00 \times 10^{-4}$	15.	АЦИ-15	$2,00 \times 10^{-4}$
2.	АЦИ-8	$7,00 \times 10^{-5}$	9.	АЦИ-6	$1,50 \times 10^{-4}$	16.	АЦИ-1	$3,00 \times 10^{-4}$
3.	RU-136	$7,70 \times 10^{-5}$	10.	АЦИ-7	$1,50 \times 10^{-4}$	17.	АЦИ-9	$3,00 \times 10^{-4}$
4.	АЦИ-5	$8,00 \times 10^{-5}$	11.	АЦИ-14	$1,50 \times 10^{-4}$	18.	АЦИ-10	$4,00 \times 10^{-4}$
5.	АЦИ-4	$1,00 \times 10^{-4}$	12.	АЦИ-17	$1,50 \times 10^{-4}$	19.	АЦИ-12	$4,00 \times 10^{-4}$
6.	АЦИ-11	$1,00 \times 10^{-4}$	13.	АЦИ-2	$2,00 \times 10^{-4}$	20.	АЦИ-13	$1,00 \times 10^{-3}$
7.	АЦИ-16	$1,00 \times 10^{-4}$	14.	АЦИ-3	$2,00 \times 10^{-4}$			
Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы								
1.	RU-1306	$3,00 \times 10^{-5}$	6.	RU-1302	$1,00 \times 10^{-4}$	11.	RU-1314	$2,00 \times 10^{-4}$
2.	RU-1310	$3,00 \times 10^{-5}$	7.	RU-1304	$1,00 \times 10^{-4}$	12.	RU-1157	$3,00 \times 10^{-4}$
3.	RU-835	$6,00 \times 10^{-5}$	8.	RU-1318	$1,00 \times 10^{-4}$	13.	RU-1298	$5,00 \times 10^{-4}$
4.	RU-1308	$6,00 \times 10^{-5}$	9.	RU-1156	$1,50 \times 10^{-4}$	14.	RU-1300	>0.001
5.	RU-898	$1,00 \times 10^{-4}$	10.	RU-1313	$1,50 \times 10^{-4}$	15.	RU-1315	>0.001
Препараты сравнения								
1.	Морицизин	$5,10 \times 10^{-5}$	2.	Амиодарон	$1,7 \times 10^{-4}$	3.	Хинидин	$3,4 \times 10^{-4}$

**Расширенный подструктурный анализ влияния типа ядра** на уровень антиаритмической активности по воздействию на возбудимость изолированных предсердий крыс, проведенный для 468 соединений, выявил описанные ниже следующие закономерности.

Так, при анализе влияния базовой структуры на уровень антиаритмической активности «очень высокий» было показано, что производные классов N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых антиаритмических соединений: индексы значимости +5,0 и +3,0 соответственно (табл. 2.3, рис. 2.6А).

В результате расширенного подструктурного анализа статистическая значимость активности производных N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола снизилась. Базовая структура в данном случае оказывает слабое положительное недостоверное влияние на «очень высокий» уровень активности с индексом значимости +2. Здесь, возможно более существенное влияние играют заместители.

Анализ показал, что базовые структуры N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N<sup>1</sup>-бензимидазола, пирроло[1,2-*a*]бензимидазола, 2,3-дигидро-N<sup>1</sup>-бензимидазола являются высокодостоверными признаками отсутствия активности: так как индекс значимости равен -5 у всех классов соединений. Для производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола также не характерна способность проявлять очень высокую активность, так как Ind равен -3.

Ind равный -0,2 для производных класса пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола свидетельствует об отсутствии существенного влияния базовой структуры на «очень высокий» уровень активности. Вероятно, в этом случае детерминирующее значение имеют типы присоединенных к этой структуре заместителей. Для производных класса N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов каких-либо обоснованных выводов сделать нельзя в связи с малым объемом выборки.

При анализе влияния типа ядра на «высокий» уровень активности (табл. 2.3 и рис. 2.6Б) было показано, что он достоверно характерен для производных класса N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов (Ind = +3). Для ядер N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола, N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола будет характерно слабое

положительное недостоверное влияние на «высокий» уровень активности, так как индексы значимости равны 2, 1 и 1 соответственно.

Таблица 2.3

**Расширенный подструктурный анализ влияния типа базовой структуры на уровни антиаритмической активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов**

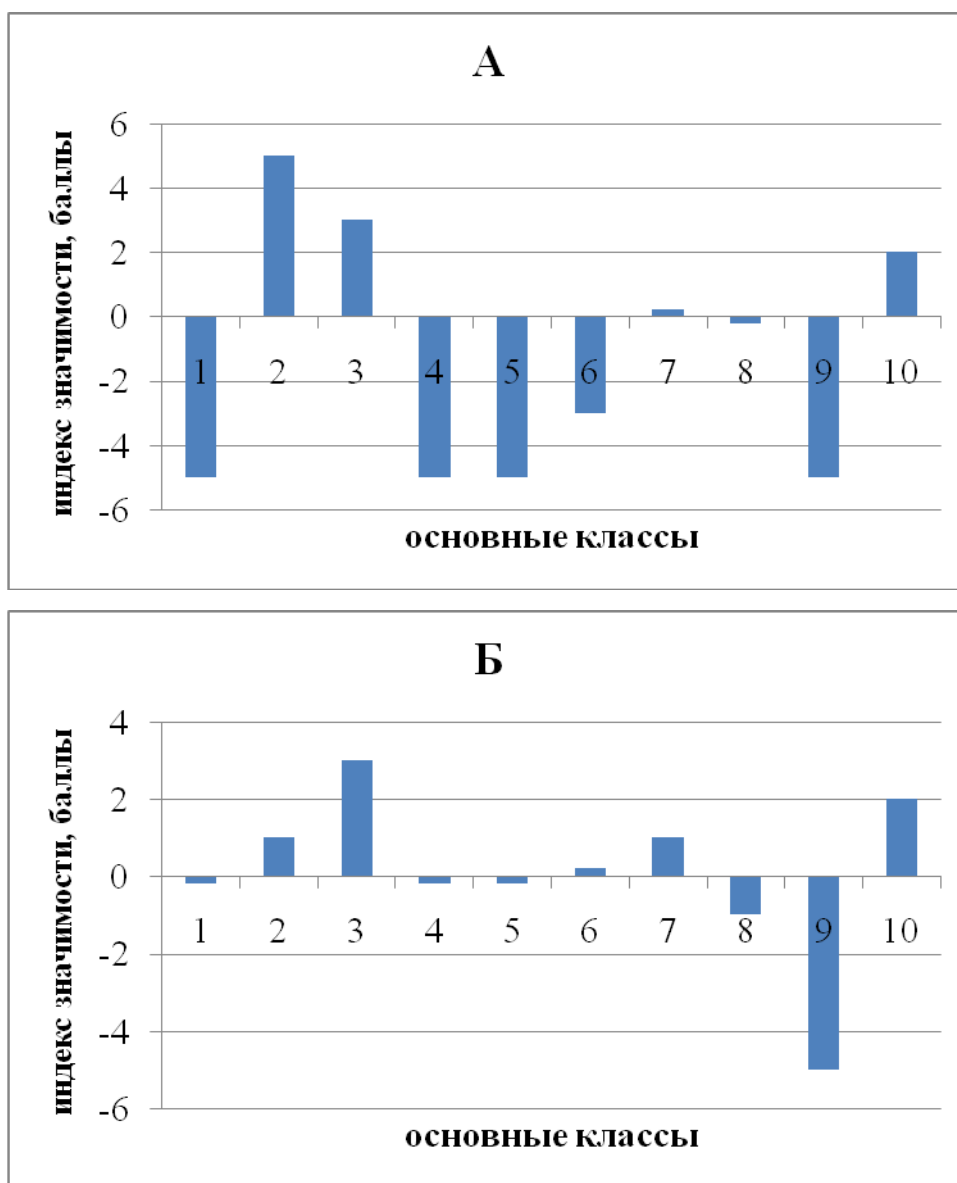
№	Химический класс	n	P <sub>h</sub> <sup>1)</sup>	P <sub>nh</sub> <sup>2)</sup>	Z <sup>3)</sup>	Pr <sup>4)</sup>	Ind <sup>5)</sup>
Влияние на «очень высокий» <sup>*</sup> уровень активности							
1	N <sup>1</sup> -бензимидазолы	72	0,2388	0,7612	5,264	7,06*10 <sup>-8</sup>	-5,0
2	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	230	0,5984	0,4016	4,609	2,03*10 <sup>-6</sup>	5,0
3	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	38	0,6062	0,3938	2,041	2,06*10 <sup>-2</sup>	3,0
4	N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы	14	0,1033	0,8967	3,376	3,68*10 <sup>-4</sup>	-5,0
5	2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы	29	0,0559	0,9441	5,231	8,42*10 <sup>-8</sup>	-5,0
6	N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы	23	0,3383	0,6617	1,952	2,55*10 <sup>-2</sup>	-3,0
7	Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы	18	0,5584	0,4416	0,702	2,41*10 <sup>-1</sup>	0,2
8	N <sup>1</sup> ,N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	2	0,3229	0,6771	0,680	2,48*10 <sup>-1</sup>	-0,2
9	Пирроло[1,2-а]бензимидазолы	27	0,0595	0,9405	5,021	2,57*10 <sup>-7</sup>	-5,0
10	N <sup>4</sup> -пиразоло[1,5-а]бензимидазолы	24	0,5904	0,4096	1,349	8,87*10 <sup>-2</sup>	2,0
Влияние на «высокий» <sup>†</sup> уровень активности							
1	N <sup>1</sup> -бензимидазолы	72	0,4785	0,5215	0,477	3,17*10 <sup>-1</sup>	-0,2
2	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	230	0,5181	0,4819	0,761	2,23*10 <sup>-1</sup>	0,2
3	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	38	0,5875	0,4125	1,566	4,97*10 <sup>-2</sup>	3,0
4	N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы	14	0,4744	0,5256	0,198	4,22*10 <sup>-1</sup>	-0,2
5	2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы	29	0,4613	0,5387	0,536	2,96*10 <sup>-1</sup>	-0,2
6	N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы	23	0,5392	0,4608	0,493	3,11*10 <sup>-1</sup>	0,2
7	Пиримидо[1,2-а]бензимидазолы	18	0,5778	0,4222	0,938	1,74*10 <sup>-1</sup>	1,0
8	N <sup>1</sup> ,N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы	2	0,2899	0,7101	0,914	1,80*10 <sup>-1</sup>	-1,0
9	Пирроло[1,2-а]бензимидазолы	27	0,0464	0,9536	5,883	2,01*10 <sup>-9</sup>	-5,0
10	N <sup>4</sup> -пиразоло[1,5-а]бензимидазолы	24	0,6055	0,3945	1,521	6,42*10 <sup>-2</sup>	2,0

Примечание:

n – число соединений; <sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «очень высокая» («высокая»); <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих активности «очень высокая» («высокая»); <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различия значений P<sub>h</sub> и P<sub>nh</sub>; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие активности; <sup>5)</sup> индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).

\* МЭК < 3,74\*10<sup>-5</sup> М

† 3,74\*10<sup>-5</sup> < МЭК < 1,04\*10<sup>-4</sup> М



**Рис. 2.6. Влияние типа ядра на «очень высокий»\* (А) и «высокий»† (Б) уровни антиаритмической активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (расширенный анализ)**

Примечание: нумерация столбцов:

- |   |  |
|---|--|
| 1 N <sup>1</sup> -бензимидазолы                                     | 7 Пиримидо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы                                |
| 2 N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы              | 8 N <sup>1</sup> ,N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы |
| 3 N <sup>1</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы              | 9 Пирроло[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы                                 |
| 4 N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2- <i>a</i> ] бензимидазолы | 10 N <sup>4</sup> -пиразоло[1,5- <i>a</i> ]бензимидазолы               |
| 5 2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы                         |  |
| 6 N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2- <i>a</i> ] бензимидазолы |  |

Индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла - сильное, 5 баллов - очень сильное; «+» - положительное или «-» - отрицательное влияние)

\* МЭК < 3,74 \* 10<sup>-5</sup> М

† 3,74 \* 10<sup>-5</sup> < МЭК < 1,04 \* 10<sup>-4</sup> М

Базовая структура пирроло[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком отсутствия активности, вследствие того, что Ind равен -5.

Индекс значимости равный -0,2 для производных класса N<sup>1</sup>-бензимидазолов, N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, 2,3-дигидро-N<sup>1</sup>-бензимидазолов и +0,2 для N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов свидетельствует об отсутствии существенного влияния базовой структуры на «очень высокий» уровень активности. Вероятно, в данном случае детерминирующее значение имеют типы присоединенных к этой структуре заместителей.

### **2.3.2. Оценка перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности**

Среднее значение активностей соединений одного класса показывает *меру активности базовой структуры* без учета влияния заместителей [Голендер, 1978].

Показано, что наибольшую среднюю активность проявили соединения производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола, пирроло[1,2-*a*]бензимидазола, N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (рис.2.7, приложение 10).

Однако, с учетом данных кластерного анализа (рис. 2.4) антиаритмической активности, по показателям средних величин только производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола могут быть отнесены к классу высокоактивных соединений, так как вариативный диапазон активности этих веществ пересекает границу указанного класса.

Таким образом, еще раз было показано, что перспективным ядром для создания целевого скаффолда соединений с антиаритмической активностью, является структура бензимидазола, модифицированная путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей.

Максимальные (супремальные) оценки показывают *степень реакции базовой структуры на введение в нее заместителя*, повышающего активность.

На рис. 2.7 видно, что лидерами по величине супремальных оценок являются производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Эти вещества превосходят по максимальной величине МЭК все остальные классы в 2 раза и более (приложение 10).





**Рис. 2.7. Оценка перспективности базовых структур производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием средних и супремальных оценок уровня антиаритмической активности (абсолютные данные представлены в приложение 10)**

Результаты анализа по средним и супремальным оценкам полностью подтверждают данные, полученные при расширенном подструктурном анализе влияния типа ядра на уровни антиаритмической активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (рис. 2.6, таблица 2.3).

Обобщая результаты ретроспективного и расширенного подструктурных анализов влияния типа ядра на «очень высокий» и «высокий» уровни активности, а также анализа по средним и супремальным оценкам можно утверждать следующее:

- перспективным ядром для создания целевого скаффолда соединений с антиаритмической активностью, является структура бензимидазола, модифицированная путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей.
- производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола могут быть отнесены к принципиально новому классу (МЭК<3,74\*10<sup>-5</sup>М) антиаритмических соединений для которого характерно проявление «очень высокой» способности влиять на рефрактерность миокарда (увеличивать продолжительность рефрактерного периода);
- для ядра N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола характерен только «очень высокий» уровень активности;
- базовая структура N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности с высокой лабильностью химической структуры, поскольку этот признак устойчиво воспроизводится как для уровня «очень высокий», так и «высокий»;
- производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются перспективными как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на ее модификацию;
- производные N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых антиаритмических соединений с антифибрилляторной активностью, поэтому для них целесообразно провести детальный анализ влияния заместителей на уровни «очень высокой» антиаритмической активности;
- по совокупности статистических характеристик базовая структура N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола превосходит ядро N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола;
- у производных N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола, проявивших в

ретроспективном анализе достоверно высокую активность, по общей совокупности результатов снизилась значимость ( $p > 0,05$ ) базового ядра на уровень "очень высокой" способности влиять на возбудимость изолированных предсердий, что, вероятно, свидетельствует о существенной роли заместителей;

- достоверно показано что, для производных классов  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов,  $N^1$ -бензимидазолов, пирроло[1,2-*a*]бензимидазолов, 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолов,  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов не характерна способность влиять на рефрактерность изолированных предсердий (увеличивать продолжительность рефрактерного периода);

- для производных класса пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола воздействие основного ядра на уровни "очень высокой" и "высокой" способности влиять на возбудимость изолированных предсердий не выявлено, что, вероятно, свидетельствует о преимущественной роли заместителей; для  $N^1, N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов каких либо обоснованных выводов сделать нельзя в связи с малым числом соединений.

### **2.3.3. Подструктурный анализ влияния заместителей на уровень антиаритмической активности наиболее перспективных классов (данные расширенного подструктурного анализа)**

Результаты анализа влияния заместителей на «очень высокий» уровень антиаритмической активности производных класса  $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов приведены в табл. 2.4.

В ходе подструктурного анализа для всех трех положений  $C^3(R_1)$ ,  $C^2(R_2)$ ,  $N^9(R_3)$  удалось выявить заместители, значимо влияющие на рефрактерность изолированных предсердий (увеличивать продолжительность рефрактерного периода).

Найдены заместители, которые являются достоверными признаками «очень высокой» антиаритмической активности: в положении  $C^3$  ацетильный, метильный, пиперидинометилкарбонильный заместители ( $Ind = 5, 4$  и  $3$  соответственно); в  $C^2$  трет-бутильный, тиенильный, фенильный заместители ( $Ind = 5$  для всех); в положении  $N^9$  диэтиламиноэтильный заместитель ( $Ind = 5$ ).

Таблица 2.4

**Результаты расширенного подструктурного анализа влияния заместителей на уровень антиаритмической активности «очень высокая» \* производных N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазолов<sup>†</sup>**

№	Признак	Ph <sup>1)</sup>	Pnh <sup>2)</sup>	Z <sup>3)</sup>	Pr <sup>4)</sup>	Ind <sup>5)</sup>
<b>C<sup>3</sup>(R<sub>1</sub>)</b>						
1	–CHON(CCl <sub>3</sub> ) (2,2,2-трихлоро-1-гидроксиэтил)	0,1520	0,8480	2,3861	0,0085	<b>-4</b>
2	–COCH <sub>3</sub> (ацетил)	0,7555	0,2445	4,9861	0,0000	<b>5</b>
3	–CH <sub>3</sub> (метил)	0,7442	0,2558	2,7904	0,0026	<b>4</b>
4	–CO(CH <sub>2</sub> )NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (пиперидинометилкарбонил)	0,8324	0,1676	2,1513	0,0157	<b>3</b>
5	–COOCH <sub>3</sub> (метоксикарбонил)	0,0945	0,9055	3,6223	0,0001	<b>-5</b>
6	–COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (этоксикарбонил)	0,1841	0,8159	1,9311	0,0267	<b>-3</b>
<b>C<sup>2</sup>(R<sub>2</sub>)</b>						
1	–C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (трет-бутил)	0,7179	0,2821	3,8456	0,0001	<b>5</b>
2	–C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> S (2-тиенил)	0,8320	0,1680	5,0618	0,0000	<b>5</b>
3	–CH <sub>3</sub> (метил)	0,0492	0,9508	5,6671	0,0000	<b>-5</b>
4	–C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (фенил)	0,6600	0,3400	3,8415	0,0001	<b>5</b>
5	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl (4-хлорфенил)	0,1841	0,8159	1,9311	0,0267	<b>-3</b>
6	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F (4-фторфенил)	0,1665	0,8335	2,1670	0,0151	<b>-3</b>
7	–2,5-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub> (2,5-дигидроксифенил)	0,2057	0,7943	1,6746	0,0470	<b>-3</b>
8	–3,4-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub> (3,4-дигидроксифенил)	0,1665	0,8335	2,1670	0,0151	<b>-3</b>
9	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> (4-метоксифенил)	0,1399	0,8601	2,5913	0,0048	<b>-4</b>
10	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br (4-бромфенил)	0,1665	0,8335	2,1670	0,0151	<b>-3</b>
11	–α-C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> (α-нафтил)	0,1665	0,8335	2,1670	0,0151	<b>-3</b>
<b>N<sup>9</sup>(R<sub>3</sub>)</b>						
1	–CH <sub>3</sub> (метил)	0,1756	0,8244	4,8130	0,0000	<b>-5</b>
2	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> (диэтиламиноэтил)	0,6802	0,3198	5,3653	0,0000	<b>5</b>
3	–CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (бензил)	0,2057	0,7943	1,6746	0,0470	<b>-3</b>
4	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O (морфолиноэтил)	0,0636	0,9364	4,8069	0,0000	<b>-5</b>

Примечание: <sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «очень высокая»; <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих «очень высокой» активности; <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различия значений P<sub>h</sub> и P<sub>nh</sub>; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие очень высокой активности; <sup>5)</sup> индекс значимости ((0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).

\* МЭК < 3,74 · 10<sup>-5</sup> М

<sup>†</sup> Представлены наиболее значимые заместители.

Было показано, что нежелательно присутствие заместителей метоксикарбонила, 2,2,2-трихлоро-1-гидроксиэтила и этоксикарбонила в положении  $C^3$  (Ind = -5; -4 и -3 соответственно), метила, 4-метоксифенила, 4-хлорфенила, 4-фторфенила, 2,5-дигидроксифенила, 3,4-дигидроксифенила, 4-бромфенила,  $\alpha$ -нафтила в положении  $C^2$  (Ind = -5, -4, -3, -3, -3, -3, -3, -3 соответственно), а также метила, морфолиноэтила и бензила в положении  $N^9$  (Ind = -5, -5, -3 соответственно).

Результаты анализа влияния заместителей на «очень высокий» уровень антиаритмической активности производных класса  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов приведены в табл. 2.5. В ходе подструктурного анализа для обоих положений  $C^2(R_2)$ ,  $N^1(R_3)$  удалось выявить заместители, значимо влияющие на рефрактерность изолированных предсердий (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода).

Найдены заместители, которые являются достоверными признаками «очень высокой» антиаритмической активности: в положении  $C^2$  фенильный заместитель (Ind=+4); в положении  $N^1$  диэтиламиноэтильный и пирролидинопропильный заместители (Ind=5 и 3 соответственно).

Нежелательно присутствие заместителей 4-бромфенила в положении  $C^2$  (Ind = -3), а также пиперидинопропила и диэтиламинопропила в положении  $N^1$  (Ind = -4, -3 соответственно).

#### **2.3.4. Конструирование целевого скаффолда\* высокоактивных веществ путем объединения ядра и высокозначимых заместителей**

В результате подструктурного анализа влияния заместителей на «очень высокий» уровень антиаритмической активности удалось выявить радикалы, значимо детерминирующие в рядах  $N^1$ - и  $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов влияние на рефрактерность изолированных предсердий (рис. 2.8).

Общими для них являются в положении  $R_2$  - фенил - (Ind=+5 и +4, соответственно) и в положении  $R_3$  - диэтиламиноэтил - (Ind=+5 у обоих классов).

---

\* Скаффолд (медицинская химия) – базовая молекула (кор, ядро), модифицированная некоторыми структурными фрагментами (например, заместителями), присутствие которых может определять наличие или высокий уровень заданного вида биологической активности.

Таблица 2.5

**Расширенный подструктурный анализ влияния типа заместителя на «очень высокий»<sup>\*</sup> уровень антиаритмической активности производных N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола<sup>†</sup>**

№	Признак	P <sub>h</sub> <sup>1)</sup>	P <sub>nh</sub> <sup>2)</sup>	Z <sup>3)</sup>	Pr <sup>4)</sup>	Ind <sup>5)</sup>
<b>C<sup>2</sup>(R<sub>2</sub>)</b>						
1	–C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (трет-бутил)	0,268	0,732	1,082	0,140	<b>-1,0</b>
2	–C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> S (2-тиенил)	0,232	0,768	1,400	0,081	<b>-2,0</b>
3	–C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (фенил)	0,762	0,238	2,899	0,002	<b>4,0</b>
4	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> (4-толил)	0,690	0,310	1,287	0,099	<b>2,0</b>
5	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl (4-хлорфенил)	0,268	0,732	1,082	0,140	<b>-1,0</b>
6	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F (4-фторфенил)	0,268	0,732	1,082	0,140	<b>-1,0</b>
7	–4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br (4-бромфенил)	0,205	0,795	1,683	0,046	<b>-3,0</b>
<b>N<sup>1</sup>(R<sub>3</sub>)</b>						
1	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (пиперидиноэтил)	0,690	0,310	1,287	0,099	<b>2,0</b>
2	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (пиперидинопропил)	0,151	0,849	2,397	0,008	<b>-4,0</b>
3	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O (морфолиноэтил)	0,232	0,768	1,400	0,081	<b>-2,0</b>
4	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> (пирролидинопропил)	0,828	0,172	2,085	0,019	<b>3,0</b>
5	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> (диэтиламинопропил)	0,166	0,834	2,177	0,015	<b>-3,0</b>
6	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> (диэтиламиноэтил)	0,896	0,104	3,355	0,000	<b>5,0</b>
7	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH (гидроксиэтил)	0,268	0,732	1,082	0,140	<b>-1,0</b>

Примечание:

<sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «очень высокая»; <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих «очень высокой» активности; <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различия значений P<sub>h</sub> и P<sub>nh</sub>; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие очень высокой активности; <sup>5)</sup> индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).

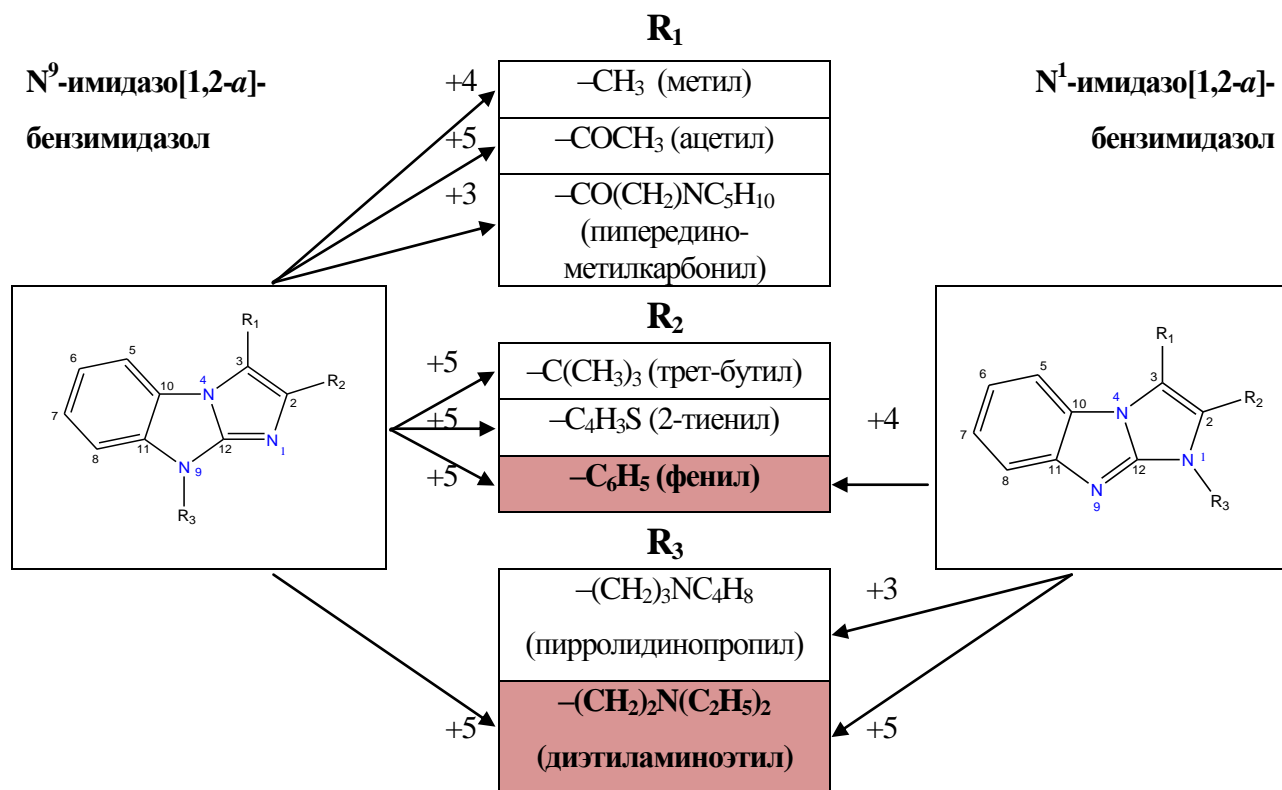
Поскольку базовая структура N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности, по совокупности статистических характеристик превосходит класс N<sup>2</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, а также обладает высокой лабильностью химической структуры, на ее основе построены скаффолды с высокой способностью влиять на рефрактерность (увеличивать продолжительность рефрактерного периода) изолированных предсердий. Пример построения целевого скаффолда представлен на рис. 2.9.

Соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – амфедазол – относится к наиболее перспективному классу N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола,

<sup>\*</sup> МЭК < 3,74 · 10<sup>-5</sup> М

<sup>†</sup> Представлены наиболее значимые заместители.

полностью включает целевой скаффолд, интенсивно влияет на рефрактерность изолированных предсердий ( $M\acute{E}K=1,60 \times 10^{-5} M$ ) (табл. 2.6). Соединение превосходит амиодарон по величине  $M\acute{E}K$  в 10 раз, по терапевтическому индексу – в 2,2 раза.



**Рис. 2.8.** Заместители, значимо детерминирующие в рядах N<sup>1</sup>- и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов влияние на рефрактерность изолированных предсердий

Таблица 2.6

**Влияние амфедазола на возбудимость изолированных предсердий крыс ( $M\acute{E}K$ ), острая токсичность ( $LD_{50}$ , внутривенно, мг/кг) и условный терапевтический индекс исследуемых веществ (УТИ)**

№	Препарат	$M\acute{E}K$ , М/л	$M\acute{E}Д$ , мг/кг	$LD_{50}$ , мг/кг	УТИ ( $LD_{50}/M\acute{E}Д$ )
1.	Амфедазол	$1,6 \times 10^{-5}$	6,5	17,0	2,6
2.	Амиодарон	$1,7 \times 10^{-4}$	115,9	135,5*	1,2

\* - по данным Beckers (1987)

Для оценки перспективности дальнейшего изучения антиаритмических свойств необходимо было провести экспериментальное изучение влияния на трансмембранные ионные токи.

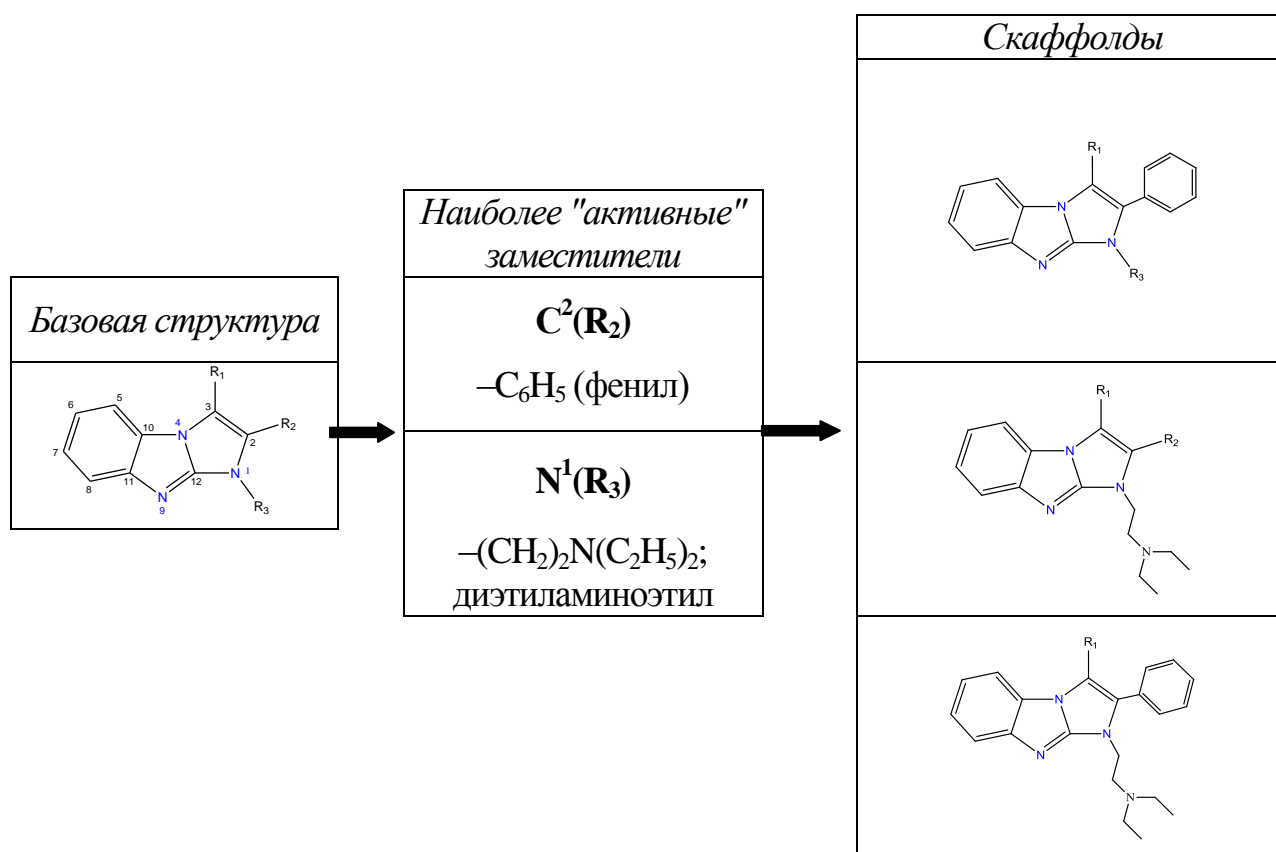


Рис 2.9. Пример построения для  $N^1$ -производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола скаффолдов с высокой антиаритмической активностью

### 2.3.5. Влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи

В исследованиях В.И. Поротикова было показано, что амфедазол оказывал сложное мембранотропное действие (табл. 2.7, приложение 38). Выявлено выраженное дозозависимое блокирующее влияние на выходящие токи калия. Так при введении амфедазола в дозе  $1 \cdot 10^{-6}$  М калиевый ток уменьшился на 39%, а уже в дозе  $5 \cdot 10^{-5}$  М был заблокирован на 60%. В отношении быстрого  $Na^+$  и медленного  $Ca^{2+}$  ионных токов дозозависимого блокирующего эффекта не наблюдалось. В дозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М соединение угнетает токи натрия и кальция на 30% и 33% соответственно. При дальнейшем увеличении доз эффект на данные трансмембранные токи практически не менялся.

Таким образом, при изучении влияния соединения на трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки выявлены выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция.



Таблица 2.7

**Влияние амфедазола на трансмембранные токи трабекул предсердия лягушек методом фиксации потенциала**

Ионные токи	Концентрация соединения (М) и эффект на ионные токи (в %)			
	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
$I_{K^+}$	-39	-45	-51	-60
$I_{Na^+}$	+15	-30	-30	-34
$I_{Ca^{2+}}$	-30	-33	-35	-34

### 2.3.6. Заключение

Таким образом, с использованием данных экспериментального и виртуального скрининга соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -бензимидазолы; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы,  $N^4$ -пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1, N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы), влияющих на рефрактерность миокарда (удлиняющих рефрактерный период изолированных предсердий крыс), проведен расширенный подструктурный анализ влияния типа ядра на уровень антиаритмической активности, рассчитаны ее средняя и супремальная оценки и определена базовая структура соединений с высокой активностью. Производные  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола оказались перспективными как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на ее модификацию. В результате подструктурного анализа влияния заместителей были выявлены значимые заместители (в положениях  $C^2(R_2)$  - фенил;  $N^1(R_3)$  - диэтиламиноэтил) и построен целевой скаффолд соединений с высокой способностью увеличивать рефрактерность изолированных предсердий. Соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (амфедазол) максимально соответствует, как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам, «обобщенному образу» активного антиаритмического соединения. Указанное вещество является перспективным для дальнейшего углубленного экспериментального изучения.

## 2.4. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ НАТРИЙ-ВОДОРОДНОГО ОБМЕННИКА 1-Й ИЗОФОРМЫ (NHE-1)

Метаболические сдвиги в кардиомиоцитах, сопровождающие многие сердечно-сосудистые заболевания, имеют важное патогенетическое значение и нередко являются определяющими для прогноза заболевания [Петров, 2007; Михин, 2009; Спасов, 2006б, 2008, 2012; Jahangir, 2007; Andreadou, 2008]. Основной вклад в процесс ликвидации внутриклеточного ацидоза в условиях ишемии на 60-70% принадлежит активации мембранных  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменников (NHE) [Зверев, 2003]. NHE-1 является основной изоформой, экспрессируемой в сердце, клетках мозга, тромбоцитах и эритроцитах [Спасов, 2013г; Masereel, 2003; Malo, 2006; Luo, 2007; Fliegel, 2009]. Ишемическая активация обменника, в конечном счете, вызывает внутриклеточную кальциевую перегрузку, усугубляющую повреждение клеток при реперфузии [Писаренко, 2004; Slepko, 2007; Fliegel, 2008, 2009]. Экспериментальные исследования на животных показали, что селективное ингибирование NHE-1 обменника сарколеммы может отсрочить прогрессию повреждений во время ишемии, тем самым ограничивая зону некроза и улучшая восстановление функции органов при реперфузии [Писаренко, 2004, 2005; Avkiran, 2003; Fliegel, 2008]. Поэтому NHE-1 рассматривают как новую мишень для цитопротекции. В настоящее время международная база данных Thomson Reuters Integrity [<http://integrity.thomson-pharma.com>] насчитывает 481 ингибитор NHE, обладающий высоким сродством к обменнику 1 типа. Среди них 262 молекулы, которые содержат свободные и встроенные гуанидиновые группировки. Поскольку отличительной особенностью производных 2-аминобензимидазола и их циклических производных является наличие гуанидиновой группы [Zhang, 2007], мы посчитали возможным провести поиск новых ингибиторов NHE-1 среди соединений данного класса.

### 2.4.1. Поиск ингибиторов NHE-1 в условиях *in vitro* среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов

На первом этапе в исследованиях *in vitro* на тромбоцитах кролика проведен поиск соединений с NHE-ингибирующей активностью среди 59 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $\text{N}^1$ -замещенные 2-

аминобензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы). Результаты представлены в табл. 2.8.

На основе полученных результатов методом кластерного анализа (приложения 11А, 11Б) были определены границы классов NHE-ингибирующей активности *in vitro* среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов для каждой из исследуемых доз и IC<sub>50</sub> и выявлены следующие классы активности (в баллах): 3 – высокоактивные; 2 – умеренно активные; 1 – низкоактивные.

Границы классов NHE-1 ингибирующей активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов составили в концентрации 1\*10<sup>-8</sup> М: высокоактивные  $\Delta(10^{-8}) > 54,0\%$ ; умеренно активные  $54,0\% \geq \Delta(10^{-8}) > 42,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-8}) < 42,0\%$ . В концентрации 1\*10<sup>-7</sup> М: высокоактивные  $\Delta(10^{-7}) > 55,0\%$ ; умеренно активные  $55,0\% \geq \Delta(10^{-7}) > 30,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-7}) < 30,0\%$ . В концентрации 1\*10<sup>-6</sup> М: высокоактивные  $\Delta(10^{-6}) > 63,0\%$ ; умеренно активные  $63,0\% \geq \Delta(10^{-6}) > 41,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-6}) < 41,0\%$ . По IC<sub>50</sub>: высокоактивные IC<sub>50</sub> < 6,54\*10<sup>-9</sup>М; умеренно активные 6,54\*10<sup>-9</sup>М ≤ IC<sub>50</sub> < 5,94\*10<sup>-8</sup>М; низкоактивные IC<sub>50</sub> ≥ 5,94\*10<sup>-8</sup>М.

Активность соединений была переведена в балльную систему и рассчитан средний балл активности NHE-1 ингибирующей активности (табл. 2.9) для проведения дальнейшего подструктурного анализа.

#### **2.4.2. Подструктурный анализ влияния типа базовой структуры изучаемых соединений на уровень NHE-1-ингибирующей активности**

На следующем этапе в наших исследованиях проведен подструктурный анализ влияния типа ядра на уровень NHE-ингибирующей активности изученных соединений и выявлены следующие закономерности.

Так, при анализе влияния базовой структуры на наличие высокой активности не было обнаружено ни одного химического ядра с достоверным индексом значимости.

Среди всех производных только для структуры N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола характерно слабое положительное влияние на уровень NHE-1-ингибирующей активности (индекс значимости +2) (табл. 2.10, рис. 2.10).

Таблица 2.8

**Влияние некоторых конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на активность NHE-1 обменника в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика (дельта %)**

№	Шифр	Ингибирующая активность		№	Шифр	Ингибирующая активность	
		в дозе 1x10 <sup>-8</sup> М	IC <sub>50</sub> (М)			в дозе 1x10 <sup>-8</sup> М	IC <sub>50</sub> (М)
N <sup>1</sup> -замещенные 2-аминобензимидазолы							
1.	ПУ-1183	46,90±18,55*	1,76x10 <sup>-8</sup>	9.	ПУ-1363	39,09±6,56*	-
2.	ПУ-1184	46,41±7,69*	3,39x10 <sup>-8</sup>	10.	ПУ-1364	33,63±4,84*	3,01x10 <sup>-8</sup>
3.	ПУ-1185	26,50±10,52*	4,05x10 <sup>-7</sup>	11.	ПУ-1365	43,20±2,42*	1,31x10 <sup>-7</sup>
4.	ПУ-1199	73,95±12,55*	6,56x10 <sup>-10</sup>	12.	ПУ-1366	26,95±11,34	-
5.	ПУ-1200	57,29±5,64*	4,56x10 <sup>-9</sup>	13.	ПУ-1369	57,40±2,07*	5,04x10 <sup>-9</sup>
6.	ПУ-1355	70,93±7,99*#	5,42x10 <sup>-10</sup>	14.	ПУ-1370	35,45±14,33	3,52x10 <sup>-8</sup>
7.	ПУ-1361	36,85±14,10*	2,23x10 <sup>-8</sup>	15.	ПУ-1390	69,47±7,57*#	6,68x10 <sup>-10</sup>
8.	ПУ-1362	45,22±24,89	-	16.			
N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы							
1.	ПУ-13	58,87±4,40*	1,00x10 <sup>-8</sup>	15.	ПУ-292	<17,95±10,15	1,36x10 <sup>-6</sup>
2.	ПУ-17	27,84±18,50	4,50x10 <sup>-8</sup>	16.	ПУ-293	35,25±9,17*	7,00x10 <sup>-8</sup>
3.	ПУ-35	<6,03±3,44#	-	17.	ПУ-294	<22,81±3,11#	-
4.	ПУ-36	<48,53±20,17	-	18.	ПУ-295	59,89±6,41*	1,37x10 <sup>-9</sup>
5.	ПУ-64	<22,45±12,88	8,53x10 <sup>-7</sup>	19.	ПУ-374	<38,62±0,04*	-
6.	ПУ-66	<38,49±10,29*	2,39x10 <sup>-7</sup>	20.	ПУ-376	<49,22±12,03*	-
7.	ПУ-67	49,03±7,56*	1,36x10 <sup>-8</sup>	21.	ПУ-474	48,68±6,15*	3,47x10 <sup>-8</sup>
8.	ПУ-87	29,46±12,71	1,34x10 <sup>-7</sup>	22.	ПУ-1189	<23,92±2,07*#	-
9.	ПУ-122	<45,74±13,48*	-	23.	ПУ-1190	52,83±7,35*	8,08x10 <sup>-9</sup>
10.	ПУ-185	<23,92±2,07*#	-	24.	ПУ-1191	<53,74±17,44*	-
11.	ПУ-264	33,04±22,03	4,61x10 <sup>-7</sup>	25.	ПУ-1193	<23,92±2,07*#	-
12.	ПУ-273	56,46±8,24*	3,23x10 <sup>-9</sup>	26.	ПУ-1204	<23,22±2,72*#	-
13.	ПУ-284	50,19±6,88*	1,28x10 <sup>-8</sup>	27.	ПУ-1205	<35,94±11,84	-
14.	ПУ-285	<41,58±4,28*	2,28x10 <sup>-7</sup>	28.	ПУ-1356	41,03±11,74*	4,13x10 <sup>-8</sup>
N <sup>1</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазолы							
1.	ПУ-354	<46,26±14,31*	-	6.	ПУ-602	39,26±15,11	3,78x10 <sup>-8</sup>
2.	ПУ-355	<47,04±14,45*	-	7.	ПУ-603	42,15±14,02*	1,12x10 <sup>-7</sup>
3.	ПУ-563	<34,40±4,78*	3,62x10 <sup>-7</sup>	8.	ПУ-606	34,21±7,87*	2,89x10 <sup>-7</sup>
4.	ПУ-574	<46,35±16,45*	-	9.	ПУ-720	52,22±2,75*	3,40x10 <sup>-8</sup>
5.	ПУ-576	<20,56±10,48	5,60x10 <sup>-7</sup>	10.	ПУ-721	<32,66±16,39	-
N <sup>1</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2-а] бензимидазолы							
1.	ПУ-504	46,06±8,87*	1,79x10 <sup>-7</sup>	3.	ПУ-515	40,90±4,14*	1,17x10 <sup>-7</sup>
2.	ПУ-505	<55,15±6,31*	-				
N <sup>9</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2-а] бензимидазолы							
1.	ПУ-254	28,64±14,49	-	3.	ПУ-283	<36,13±22,53	-
2.	ПУ-255	25,17±1,41*#	-				
Препарат сравнения							
1.	Зонипорид	48,05±7,09*	2,70x10 <sup>-8</sup>				

Различия статистически значимы по сравнению с: \* - контролем (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ), # - к зонипориду (парный тест - U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). Примечание: "-" - не изучалось.

Таблица 2.9

**Распределение производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, обладающих NHE-1-ингибирующей активностью, по классам активности с учетом результатов кластерного анализа**

№	шифр	Активность в дозах (баллы)					№	шифр	Активность в дозах (баллы)				
		$1 \times 10^{-8}$ М	$1 \times 10^{-7}$ М	$1 \times 10^{-6}$ М	$IC_{50}$ $\log(1/IC_{50})$	Средний			$1 \times 10^{-8}$ М	$1 \times 10^{-7}$ М	$1 \times 10^{-6}$ М	$IC_{50}$ $\log(1/IC_{50})$	Средний
1	РУ-1200	3	3	3	3	<b>3,0</b>	31	РУ-1191	-	-	2	-	<b>2,0</b>
2	РУ-1390	3	3	-	3	<b>3,0</b>	32	РУ-17	1	3	1	2	<b>1,8</b>
3	РУ-273	3	3	2	3	<b>2,8</b>	33	РУ-293	1	2	3	1	<b>1,8</b>
4	РУ-295	3	3	2	3	<b>2,8</b>	34	Зонипорид	2	2	-	1	<b>1,7</b>
5	РУ-1199	3	3	2	3	<b>2,8</b>	35	РУ-563	-	2	2	1	<b>1,7</b>
6	РУ-1355	3	2	3	3	<b>2,8</b>	36	РУ-87	1	2	2	1	<b>1,5</b>
7	РУ-1369	3	2	-	3	<b>2,7</b>	37	РУ-264	1	2	2	1	<b>1,5</b>
8	РУ-13	3	3	2	2	<b>2,5</b>	38	РУ-515	1	2	2	1	<b>1,5</b>
9	РУ-67	2	3	3	2	<b>2,5</b>	39	РУ-603	1	2	2	1	<b>1,5</b>
10	РУ-284	2	3	3	2	<b>2,5</b>	40	РУ-606	1	2	2	1	<b>1,5</b>
11	РУ-720	2	3	3	2	<b>2,5</b>	41	РУ-1366	1	2	-	-	<b>1,5</b>
12	РУ-1190	2	3	3	2	<b>2,5</b>	42	РУ-255	1	-	2	-	<b>1,5</b>
13	РУ-1183	2	-	3	2	<b>2,3</b>	43	РУ-1189	-	1	2	-	<b>1,5</b>
14	РУ-474	2	2	3	2	<b>2,3</b>	44	РУ-64	-	1	2	1	<b>1,3</b>
15	РУ-602	1	3	3	2	<b>2,3</b>	45	РУ-292	-	1	2	1	<b>1,3</b>
16	РУ-1356	1	3	3	2	<b>2,3</b>	46	РУ-576	-	1	2	1	<b>1,3</b>
17	РУ-1365	2	3	-	1	<b>2,0</b>	47	РУ-1363	1	2	-	1	<b>1,3</b>
18	РУ-1364	1	3	-	2	<b>2,0</b>	48	РУ-1361	1	1	-	2	<b>1,3</b>
19	РУ-1370	1	3	-	2	<b>2,0</b>	49	РУ-1185	1	-	2	1	<b>1,3</b>
20	РУ-1184	2	2	2	2	<b>2,0</b>	50	РУ-1362	1	1	-	-	<b>1,0</b>
21	РУ-504	2	2	3	1	<b>2,0</b>	51	РУ-254	1	-	1	-	<b>1,0</b>
22	РУ-285	-	2	3	1	<b>2,0</b>	52	РУ-185	-	1	1	-	<b>1,0</b>
23	РУ-66	-	2	3	1	<b>2,0</b>	53	РУ-1193	-	1	1	-	<b>1,0</b>
24	РУ-36	-	2	2	-	<b>2,0</b>	54	РУ-1204	-	1	1	-	<b>1,0</b>
25	РУ-376	-	2	-	-	<b>2,0</b>	55	РУ-35	-	-	1	-	<b>1,0</b>
26	РУ-354	-	-	2	-	<b>2,0</b>	56	РУ-283	-	-	1	-	<b>1,0</b>
27	РУ-355	-	-	2	-	<b>2,0</b>	57	РУ-294	-	-	1	-	<b>1,0</b>
28	РУ-505	-	-	2	-	<b>2,0</b>	58	РУ-374	-	-	1	-	<b>1,0</b>
29	РУ-574	-	-	2	-	<b>2,0</b>	59	РУ-721	-	-	1	-	<b>1,0</b>
30	РУ-122	-	-	2	-	<b>2,0</b>	60	РУ-1205	-	-	1	-	<b>1,0</b>

Примечание:

Класс активности (баллы): 3 – высокий; 2 – умеренный; 1 – низкий; "-" - не изучалось. Границы классов NHE-1 ингибирующей активности. В концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М: высокоактивные  $\Delta(10^{-8}) > 54,0\%$ ; умеренно активные  $54,0\% \geq \Delta(10^{-8}) > 42,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-8}) < 42,0\%$ . В концентрации  $1 \times 10^{-7}$  М: высокоактивные  $\Delta(10^{-7}) > 55,0\%$ ; умеренно активные  $55,0\% \geq \Delta(10^{-7}) > 30,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-7}) < 30,0\%$ . В концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М: высокоактивные  $\Delta(10^{-6}) > 63,0\%$ ; умеренно активные  $63,0\% \geq \Delta(10^{-6}) > 41,0\%$ ; низкоактивные  $\Delta(10^{-6}) < 41,0\%$ . В дозе  $IC_{50}$ : высокоактивные  $IC_{50} > 6,54 \times 10^{-9}$  М; умеренно активные  $6,54 \times 10^{-9} \text{ М} \leq IC_{50} < 5,94 \times 10^{-8}$  М; низкоактивные  $IC_{50} \geq 5,94 \times 10^{-8}$  М.

Базовая структура имидазо[1,2-*a*]бензимидазола показала слабое отрицательное влияние на изучаемую активность (средний индекс значимости равен -1). В обоих случаях, возможно, имеет место существенное влияние заместителей.

Таким образом, соединения класса N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых ингибиторов NHE-1.

#### **2.4.3. Определение перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных оценок уровня активности**

Результаты анализа роли базовой структуры по средним и супремальным оценкам полностью подтверждают данные, полученные при подструктурном анализе влияния типа ядра на уровни NHE-ингибирующей активности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов.

Так, при оценке по "средним" активность N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (за исключением N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов) в достаточно низкой дозе  $1 \times 10^{-8}$  М практически не различалась (рис. 2.11, приложение 12).

В концентрации  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  М наибольшую активность проявили N<sup>1</sup>-замещенные производные 2-аминобензимидазола. Даже по средним оценкам эти производные попадают в класс высокоактивных структур (по данным кластерного анализа NHE-ингибирующего действия,  $\Delta(10^{-7}) > 55,0\%$  и  $\Delta(10^{-6}) > 63,0\%$ ). По средней величине IC<sub>50</sub> наблюдались еще более значительные различия.

Поскольку оценка по среднему определяет активность базовой структуры без учета влияния заместителей, из полученных результатов следует, что перспективным ядром для создания целевого скаффолда соединений с NHE-ингибирующей активностью остается структура бензимидазола.

По максимальным (супремальным) значениям наблюдались отличия среди различных производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы). В соответствии с

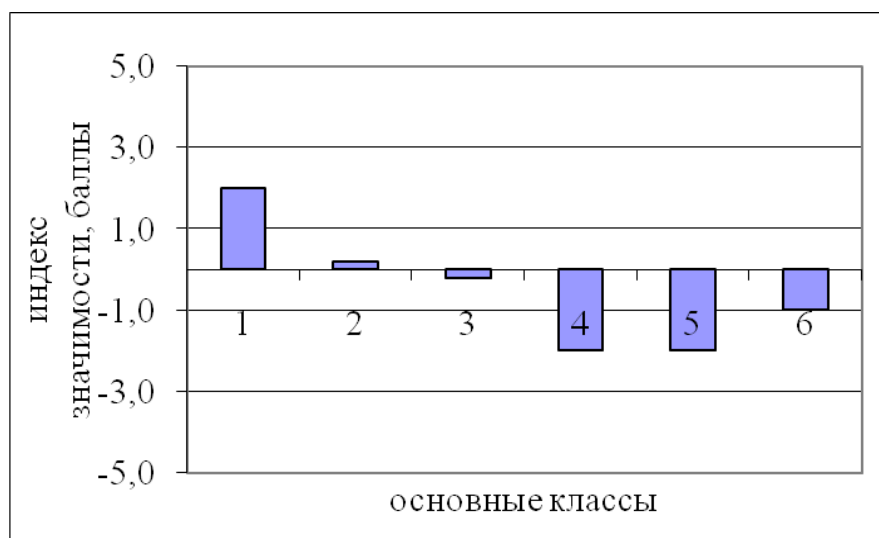
супремальными оценками, наибольшую активность по всем тестируемым показателям проявили N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы (рис. 2.12, приложение 12).

Таблица 2.10

**Подструктурный анализ влияния типа ядра на наличие высокой NHE-ингибирующей активности\* производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов**

№	Химический класс	n	P <sub>h</sub> <sup>1)</sup>	P <sub>nh</sub> <sup>2)</sup>	Z <sup>3)</sup>	Pr <sup>4)</sup>	Ind <sup>5)</sup>
1	N <sup>1</sup> -замещенные 2-аминобензимидазолы	15	0,6142	0,3858	1,322	9,32*10 <sup>-2</sup>	<b>2</b>
2	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	28	0,5303	0,4697	0,421	3,37*10 <sup>-1</sup>	<b>0,2</b>
3	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	10	0,4077	0,5923	0,765	2,22*10 <sup>-1</sup>	<b>-0,2</b>
4	N <sup>1</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	3	0,2443	0,7557	1,288	9,88*10 <sup>-2</sup>	<b>-2,0</b>
5	N <sup>9</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	3	0,2443	0,7557	1,288	9,88*10 <sup>-2</sup>	<b>-2,0</b>
6	Все имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы <sup>†</sup>	44	0,4523	0,5477	0,854	1,96*10 <sup>-1</sup>	<b>-1,0</b>

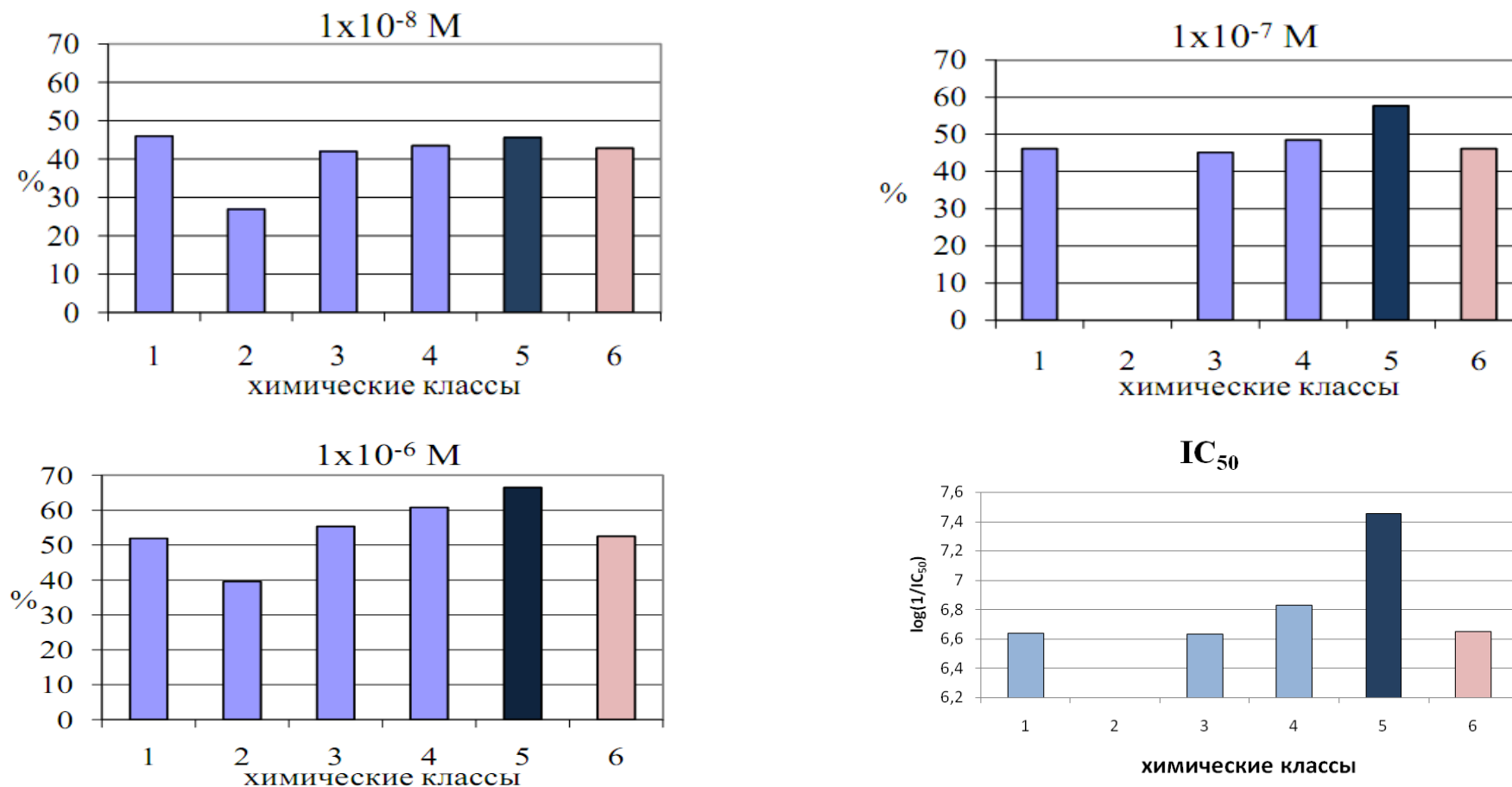
Примечание: n – число соединений; <sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «высокая»; <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ, не имеющих высокой активности; <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различие значений P<sub>h</sub> и P<sub>nh</sub>; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие высокой активности; <sup>5)</sup> индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).



**Рис. 2.10. Влияние типа ядра на высокий уровень NHE-ингибирующей активности. Примечание: нумерация столбцов соответствует нумерации химических классов в табл. 2.10**

\* Объединенная оценка активности "High" > 2.0 баллов (см. табл. 2.8.)

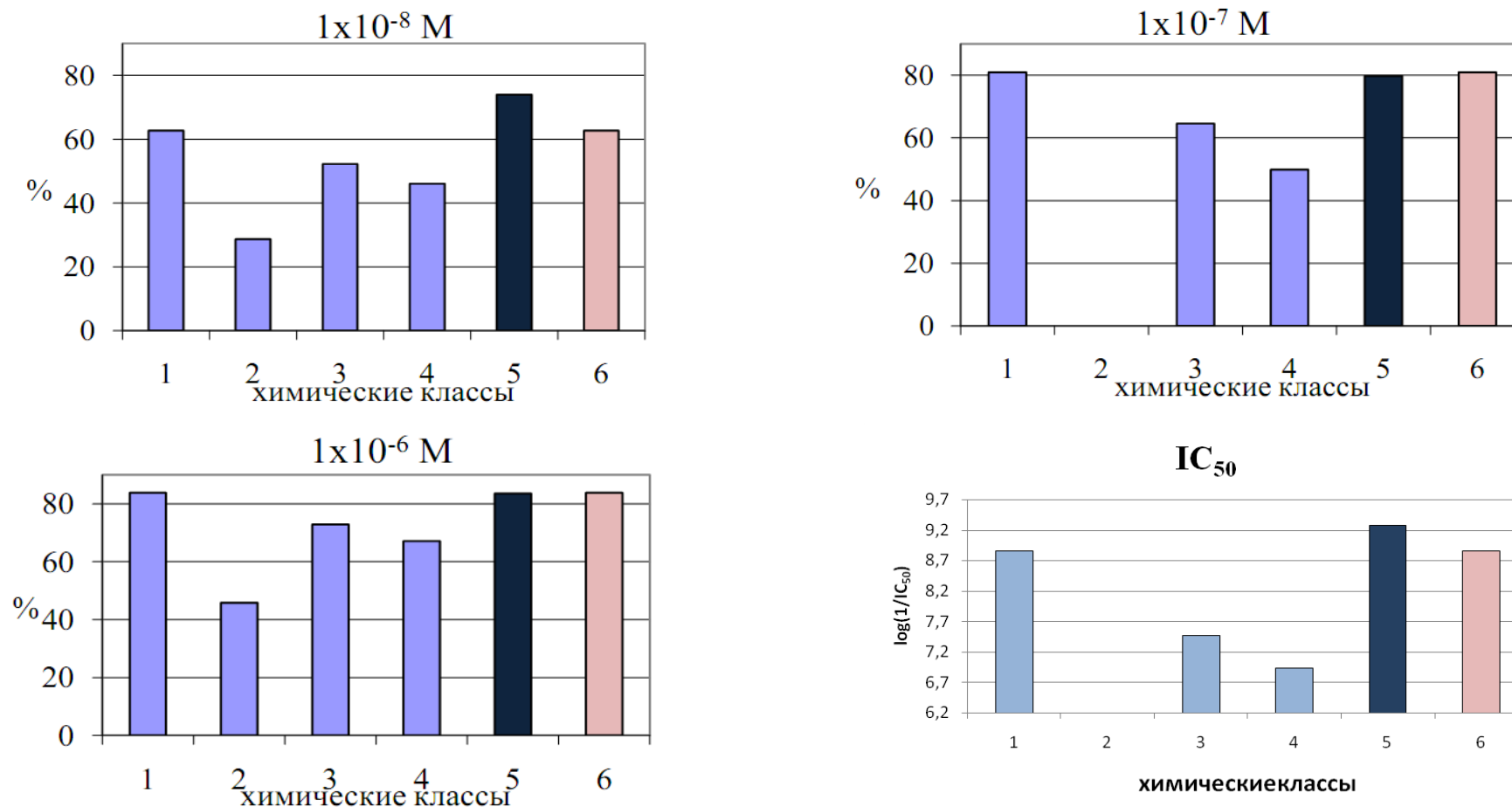
† - обобщенное, включает предыдущие N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы, N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>1</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы



**Рис. 2.11. Оценка перспективности химических ядер производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием средних оценок уровня NHE-ингибирующей активности (см. приложение 12)**

Обозначения классов: 1 - N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 2 - N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; 3 - N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 4 - N<sup>1</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; 5 - N<sup>1</sup>-замещенные 2-аминобензимидазолы; 6 - все имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы.





**Рис. 2.12. Оценка перспективности химических ядер производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием супремальных оценок уровня НН-ингибирующей активности (см. приложение 12)**

Обозначения классов: 1 - N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 2 - N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; 3 - N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; 4 - N<sup>1</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; 5 - N<sup>1</sup>-замещенные 2-аминобензимидазолы; 6 - все имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы.

При сравнительной оценке по "максимальным" N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола выявлены различия только по величине IC<sub>50</sub>. Это связано с тем, что в концентрациях 10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> М наиболее активные соединения проявляют NHE-ингибирующие свойства больше чем на 50%. А при расчете IC<sub>50</sub> можно оценить диапазон (широту) биологической активности более правильно.

**Обобщая результаты** подструктурного анализа влияния типа ядра на «высокий» уровень NHE-ингибирующей активности, а также анализа по средним и супремальным оценкам, можно утверждать следующее:

- полученные результаты свидетельствует об отсутствии значимого влияния базовой структуры на высокий уровень активности, более существенным является влияние заместителей.
- перспективным ядром для создания целевого скаффолда соединений с NHE-ингибирующей активностью является структура 2-аминобензимидазола;
- N<sup>1</sup>-замещенные 2-аминобензимидазолы являются наиболее перспективными для разработки структурно новых противоишемических соединений с NHE-ингибирующей активностью, поэтому для них целесообразно провести детальный анализ заместителей.

#### **2.4.4. Подструктурный анализ влияния заместителей на уровень NHE-1-ингибирующей активности N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола**

Подструктурный анализ влияния типа заместителя на «высокий» уровень NHE-ингибирующей активности 2-аминобензимидазола был проведен только для радикалов в положении N<sup>1</sup>. Заместители в положении N<sup>3</sup> не рассматривались ввиду их низкой варибельности.

Результаты анализа влияния заместителей на «высокий» уровень NHE-ингибирующей активности приведены в табл. 2.11. Найден заместитель в положении N<sup>1</sup>, который является достоверным признаком высокой NHE-ингибирующей активности: морфолиноэтильный (Ind=3). Пиперидиноэтильный заместитель имеет индекс значимости +2 (слабое влияние).

Таблица 2.11

**Подструктурный анализ влияния типа заместителя на «высокий»<sup>1</sup> уровень  
NHE-ингибирующей активности производных бензимидазола<sup>2</sup>**

№	Признак	P <sub>h</sub> <sup>1)</sup>	P <sub>nh</sub> <sup>2)</sup>	Z <sup>3)</sup>	Pr <sup>4)</sup>	Ind <sup>5)</sup>
<b>N<sup>1</sup> (R<sub>3</sub>)</b>						
1	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> (пиперидиноэтил)	0,778	0,222	1,500	0,067	<b>2,0</b>
2	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O (морфолиноэтил)	0,826	0,174	2,064	0,019	<b>3,0</b>

Примечание: <sup>1)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ с уровнем активности «высокая»; <sup>2)</sup> Байесовская вероятность встречаемости соединений данного класса среди веществ не имеющих «высокой» активности; <sup>3)</sup> биномиальный критерий, характеризующий различия значений P<sub>h</sub> и P<sub>nh</sub>; <sup>4)</sup> достоверность влияния типа ядра на наличие или отсутствие высокой активности; <sup>5)</sup> индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 – отсутствие влияния, 1 балл – тенденция, 2 балла – слабое, 3 балла – выраженное статистически достоверное, 4 балла – сильное, 5 баллов – очень сильное; «+» – положительное или «-» – отрицательное влияние).

**2.4.5. Конструирование скаффолда высокоактивных веществ путем  
объединения ядра и высокоактивных заместителей**

В результате подструктурного анализа влияния типа ядра и заместителей на «высокий» уровень NHE-ингибирующей активности и анализа активности по средним и супремальным оценкам было показано, что перспективной базовой структурой для создания целевого скаффолда является 2-аминобензимидазол. При детальном рассмотрении строения изучаемых соединений выявлено, что все они являются замещенными по фенильному кольцу N<sup>1</sup>-производными 2-амино-3-(фенилкарбоксометил)-бензимидазолия. Поэтому в качестве ядра для последующего конструирования целевого скаффолда был использован именно 2-амино-3-(фенилкарбоксометил)-бензимидазолий.

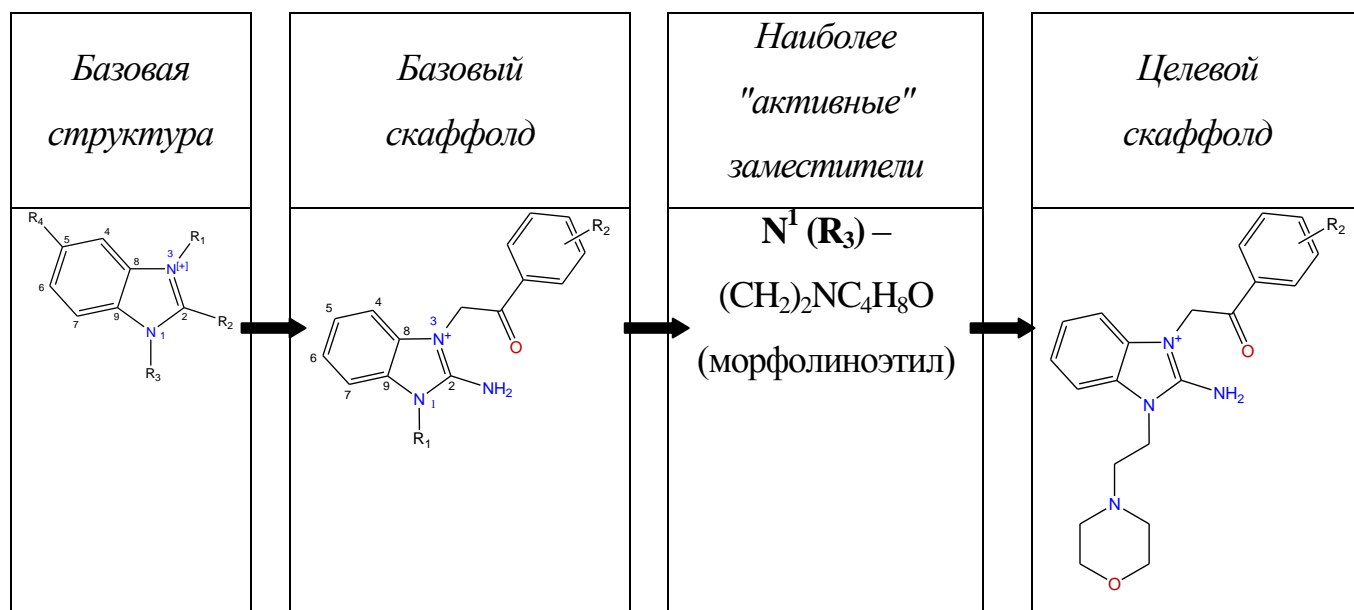
Достоверное положительное влияние на уровень активности имеет заместитель N<sup>1</sup>-морфолиноэтил. Объединением этого заместителя и базовой структуры получен целевой скаффолд, представленный на рис. 2.13.

Соединение РУ-1355 относится к наиболее перспективному классу N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола, полностью включает целевой скаффолд, активно

<sup>1</sup> Объединенная оценка активности "High" > 2.0 баллов (см. табл. 2.8.)

<sup>2</sup> Представлены наиболее значимые заместители.

ингибирует NHE тромбоцитов кролика ( $IC_{50}=5,4 \cdot 10^{-10}$  М), по терапевтическому индексу превосходит препарат сравнения зонипорид (табл. 2.12).



**Рис. 2.13.** Пример построения скаффолда с высокой NHE-ингибирующей активностью для производных бензимидазола

*Таблица 2.12*

**Влияние соединения РУ-1355 на активность NHE-1 в экспериментах *in vitro* на тромбоцитах кролика ( $IC_{50}$ ), острая токсичность ( $LD_{50}$ , внутривенно, мг/кг)**

№	Вещество	ингибирование NHE $IC_{50}$ , М	$LD_{50}$ , мг/кг
1.	Соединение РУ-1355	$5,42 \times 10^{-10}$	342,7
2.	Зонипорид	$2,70 \times 10^{-8}$	250*

\* - Tracey, 2003.

Для оценки перспективности дальнейшего изучения кардиопротекторных свойств необходимо провести экспериментальное изучение противоишемического действия соединения в условиях *in vivo*.

#### **2.4.6. Противоишемические свойства соединения РУ-1355 в условиях *in vivo***

Оценку кардиопротекторного действия соединения РУ-1355 проводили на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении в эквимолярной зонипориду дозе 1,12 мг/кг за 10 минут до реперфузии с учетом тяжести ишемического повреждения (размеров

анатомической зоны повреждения, повышения уровня специфического маркера тропонина I).

У всех животных при проведении перевязки левой коронарной артерии на ЭКГ во II стандартном отведении наблюдали признаки ишемии (подъемы сегмента ST, снижение амплитуды зубца R). Динамика роста сегмента ST на этапах длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс представлена в табл. 2.13. У контрольных животных подъем сегмента ST сохранялся на достаточно высоком уровне как в период ишемии, так и весь постреперфузионный период, что свидетельствует о дополнительном повреждающем действии реперфузии на миокард [Нарыжная, 2012].

В группе животных, которым вводили зонипорид за 10 минут до реперфузии, в постреперфузионный период наметилась тенденция к снижению подъема сегмента ST и к 60-й минуте он достоверно уменьшился на 28% по отношению к контролю и на 45,5% по отношению к ишемии на 50 минуте (табл. 2.13). Полной нормализации уровня сегмента ST не происходило.

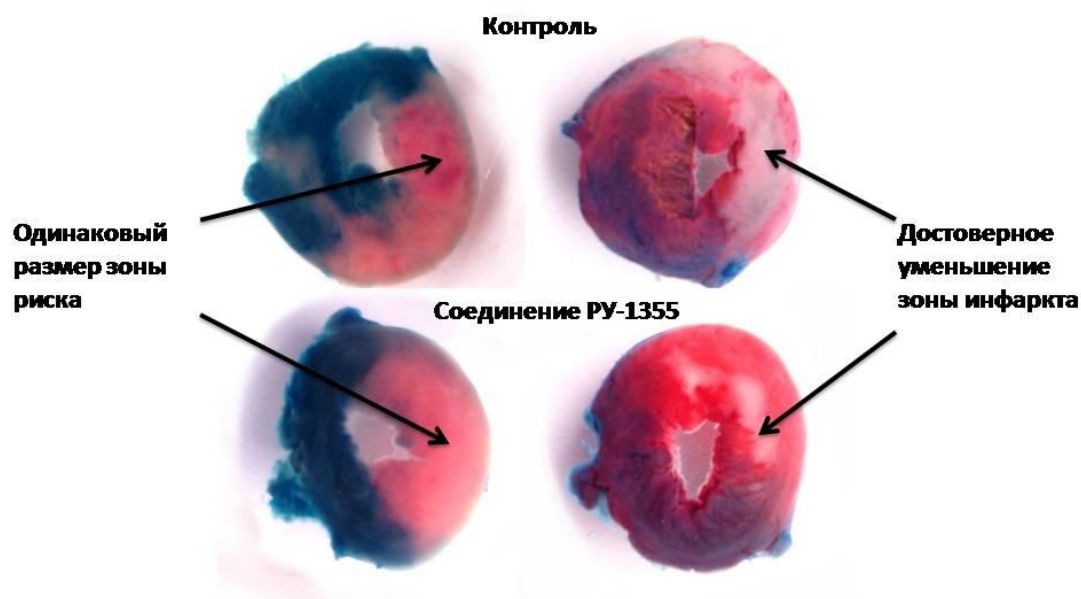
В группе животных, которым вводили соединение РУ-1355, к 60-й минуте реперфузии наблюдалось статистически значимое снижение подъема сегмента ST и составило 32% по отношению к контролю и 43,3% по отношению к ишемии на 50 минуте (табл. 2.13).

Таблица 2.13

**Влияние соединения РУ-1355 на динамику подъема сегмента ST на этапах 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии (мВ,  $M \pm m$ )**

№	Вещество	n	Исход	Ишемия, 50 минут <sup>1</sup>	Реперфузии	
					5 минут	60 минут
1.	Ложно-оперированные	6	0,10±0,03	0,11±0,03	0,12±0,03	0,12±0,09
2.	Ишемия/реперфузия	12	0,08±0,03	0,68±0,08*	0,52±0,05*	0,50±0,03* <sup>\$</sup>
3.	Зонипорид, 1 мг/кг	14	0,10±0,03	0,66±0,07*	0,48±0,06* <sup>\$</sup>	0,36±0,05* <sup>#</sup>
4.	Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг	12	0,12±0,04	0,60±0,08*	0,62±0,09*	0,34±0,04* <sup>#</sup> <sup>\$</sup>

Примечания: <sup>1</sup> - время введения вещества. Различия статистически значимы по сравнению с: \* - исходом, <sup>\$</sup> - с ишемией 50 минут в своей группе (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ); # - к группе "ишемия/реперфузия" (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).



**Рис. 2.14.** Влияние соединения РУ-1355 на зоны риска и инфаркта миокарда на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией у крыс при однократном внутривенном введении в дозе, эквивалентной молекулярной массе зонипорида, (1,12 мг/кг) за 10 минут до реперфузии.

**Примечание:** метод двойного окрашивания синим Эвансом и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом: темносиние участки- зона здорового миокарда, розовая - зона риска, белые участки - зоны некроза.

В конце периода реперфузии после внутривенного введения синего Эванса (СЭ) у животных с ишемией/реперфузией происходила визуализация зон риска. Во всех группах она составила в среднем от 43 до 53% площади левого желудочка (табл. 2.14). При последующем окрашивании *ex vivo* поперечных срезов 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТФТ) была определена зона некроза, которая у контрольных животных составила 44,36% зоны риска (рис. 2.14, табл. 2.14).

В группах животных, получавших зонипорид и РУ-1355, наблюдалось достоверное уменьшение зоны инфаркта по сравнению с контрольными животными с ишемией в 1,4 и 1,8 раза соответственно. Эффект соединения РУ-1355 статистически значимо превосходил действие зонипорида в 1,3 раза.

У животных группы «контроль-ишемия/реперфузия» был выявлен достоверно

высокий уровень тропонина I (528,32 Пкг/мл) в плазме крови, в 4 раза превосходящий данный показатель у ложнооперированных (табл. 2.14). В группе «ишемия/реперфузия+зонипорид» наблюдался в 2,1 раза более низкий уровень маркера повреждения тропонина I по отношению к группе «контроль-ишемия/реперфузия» ( $p<0,05$ ). В группе «ишемия/реперфузия+РУ-1355» уровень тропонина I в плазме крови был в 2,5 раза ниже контрольной группы животных с патологией ( $p<0,05$ ).

Таблица 2.14

**Влияние соединения РУ-1355 на основные показатели, подтверждающие кардиопротекторное действие на модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении за 10 минут до реперфузии ( $M\pm m$ )**

№	Группа	n	Размеры зоны риска (% по отношению к левому желудочку)	Размеры зоны некроза (% по отношению к зоне риска)	Уровень тропонина I (Пкг/мл)
1.	Ложнооперированные	6	0,00±0,00	0,00±0,00	136,65±38,03
2.	Ишемия/реперфузия	6	53,20±4,99 <sup>#</sup>	44,36±3,79 <sup>#</sup>	528,32±81,32 <sup>#</sup>
3.	Зонипорид, 1 мг/кг	7	47,25±3,82 <sup>#</sup>	31,18±2,98 <sup>*#</sup>	252,76±72,05 <sup>*#</sup>
4.	Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг	7	46,33±3,20 <sup>#</sup>	24,10±1,47 <sup>*\$#</sup>	211,88±60,14 <sup>*#</sup>

Примечания: Различия статистически значимы (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна,  $p<0,05$ ) по сравнению с: \* - контролем патологии, <sup>#</sup> - ложнооперированными, <sup>\$</sup> - зонипоридом.

Таким образом, на основании проведенных исследований было показано, что зонипорид и соединение РУ-1355 оказывают кардиопротекторное действие на модели длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс. Вещества снижают тяжесть ишемического повреждения миокарда, о чем свидетельствует уменьшение зоны некроза и содержания тропонина I.

#### **2.4.6. Заключение**

Таким образом, с использованием данных экспериментального скрининга соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $N^1$ -замещенные 2-аминобензимидазолы;  $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы), ингибирующих NHE

тромбоцитов кролика, проведен подструктурный анализ влияния типа ядра на высокий уровень активности и рассчитаны ее средняя и супремальная оценки. Базовая структура 2-аминобензимидазола оказалась наиболее перспективной, как по своему вкладу в активность соединений, так и по степени лабильности при модификации ее заместителями. В результате подструктурного анализа был выявлен заместитель N<sup>1</sup>-морфолиноэтил, определяющий NHE-1 ингибирующую активность. Построен целевой скаффолд соединений с высокой NHE-1-ингибирующей активностью – 1-морфолиноэтил-2-амино-3-(фенилкарбоксометил)-бензимидазолий. Найдено соединение РУ-1355, которое максимально соответствует по вычислительным и экспериментальным оценкам *in vitro* и *in vivo*, «обобщенному образу» активного противоишемического соединения. Указанное вещество является перспективным для дальнейшего углубленного экспериментального изучения.

## **2.5. ПОИСК ИНОТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ**

Ингибиторы ФДЭ миокарда превосходят сердечные гликозиды по способности усиливать сократимость миокарда. Они увеличивают внутриклеточное содержание цАМФ за счет уменьшения его разрушения (ингибирование ФДЭ-3). Накопление цАМФ сопровождается повышением концентрации кальция в клетках, которое в свою очередь ведет к увеличению сократимости миокарда в систолу и скорости его расслабления в диастолу.

Ингибиторы ФДЭ нового поколения обладают не только кардиотонической, но и кардиопротекторной активностью. Предполагаемые защитные механизмы действия от вызываемого ишемией-реперфузией повреждения кардиомиоцитов - возможность стабилизировать цитоскелет и сократительные волокна [Rao, 2009; Osadchii, 2007c].

Многие известные ингибиторы ФДЭ-3 являются производными имидазола (эноксимон) и бензимидазола (адибендан, пимобендан, сульмазол). Они усиливают инотропную функцию в результате повышения внутриклеточного кальция и усиления чувствительности миофиламентов к кальцию. Поэтому был проведен поиск ингибиторов миокардиальной ФДЭ среди производных бензимидазола.



### **2.5.1. Изучение *in vitro* влияния веществ на активность фосфодиэстеразы кардиомиоцитов и сократимость изолированных предсердий**

Ранее в исследованиях *in vitro* [Ларионов, 1988] было изучено влияние 60 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (бензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы) на активность в отношении фосфодиэстеразы миокарда.

В кардиомиоцитах присутствуют ФДЭ 1-5 изоформ. В тех случаях, когда исследования проводятся на гомогенате миокарда, изоформа полученной фосфодиэстеразы неизвестна. Поскольку инотропные реакции соединений связаны с ингибированием ФДЭ 3 изоформы миокарда и обусловлены цАМФ-РКА-опосредованным возбуждением I<sub>Ca2+</sub>, который запускает выброс Ca<sup>2+</sup> из СПР, необходимо исключить участие кальмодулинзависимых форм ФДЭ, присутствующих в кардиомиоцитах (например, ФДЭ 1). Поэтому были использованы данные Ларионова [1988] об активности фосфодиэстеразы без (приложение 1, 39; табл. 2.15) и в присутствии кальмодулина (приложение 39; табл. 2.15).

Миокардиальная ФДЭ-3 является мембраносвязанным белком, поэтому для подтверждения того, что в гомогенате фермент сохранился в нативной форме, были проведены уточняющие исследования на изолированных органах (раздел самостоятельных исследований). Влияние на сократимость предсердия изучено для соединений с высокой антифосфодиэстеразной активностью и хорошо растворимых в воде (табл. 2.15).

Полученные данные были переведены в ранговую форму: для влияния на ФДЭ без кальмодулина и на изолированные предсердия – в порядке убывания активности, а на ФДЭ в присутствии кальмодулина – в порядке увеличения. Степень влияния каждого соединения на миокардиальную ФДЭ рассчитывали как средний ранг трех указанных показателей.

Таблица 2.15

**Сравнительный анализ антифосфодиэстеразной активности и влияния на сократимость изолированных предсердий производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов методом средних ранговых оценок<sup>1</sup>**

№	Вещество	Влияние на активность ФДЭ миокарда (ингибирование)				Влияние на сократительную активность изолированных предсердий IC <sub>50</sub>		Ранговая оценка, средняя величина
		Без кальмодулина		В присутствии кальмодулина		М	Ранг <sup>1)</sup>	
		%	Ранг <sup>1)</sup>	%	Ранг <sup>2)</sup>			
1.	РУ-539	-66,67	11	-7,78	4	4,20x10 <sup>-7</sup>	5	<b>6,7</b>
2.	РУ-284	-66,67	11	-47,07	25	1,00x10 <sup>-6</sup>	7	<b>14,3</b>
3.	РУ-458	-89,48	2	-60,80	40	1,00x10 <sup>-6</sup>	7	<b>16,3</b>
4.	РУС-94	-54,55	21	-21,24	14	1,83x10 <sup>-5</sup>	15	<b>16,7</b>
5.	РУ-534	-56,00	19	-49,21	26	7,00x10 <sup>-7</sup>	6	<b>17,0</b>
6.	РУ-467	-56,00	19	-55,56	31	1,00x10 <sup>-6</sup>	7	<b>19,0</b>
7.	РУ-451	-96,00	1	-84,93	57	3,00x10 <sup>-7</sup>	1	<b>19,7</b>
8.	РУС-98	-81,82	5	-64,71	44	1,70x10 <sup>-6</sup>	11	<b>20,0</b>
9.	РУ-503	-80,00	6	-78,58	53	3,70x10 <sup>-7</sup>	3	<b>20,7</b>
10.	РУ-616	-54,29	22	-52,77	27	3,70x10 <sup>-6</sup>	13	<b>20,7</b>
11.	РУ-541	-64,00	13	-60,00	38	6,60x10 <sup>-6</sup>	14	<b>21,7</b>
12.	РУ-597	-71,43	9	-80,91	55	3,50x10 <sup>-7</sup>	2	<b>22,0</b>
13.	РУ-576	-48,57	23	-55,78	32	1,90x10 <sup>-6</sup>	12	<b>22,3</b>
14.	РУ-619	-60,00	16	-62,82	42	1,10x10 <sup>-6</sup>	10	<b>22,7</b>
15.	РУ-502	-76,00	7	-85,72	59	3,90x10 <sup>-7</sup>	4	<b>23,3</b>
16.	РУС-38	-58,33	18	-69,03	46	2,00x10 <sup>-5</sup>	16	<b>26,7</b>

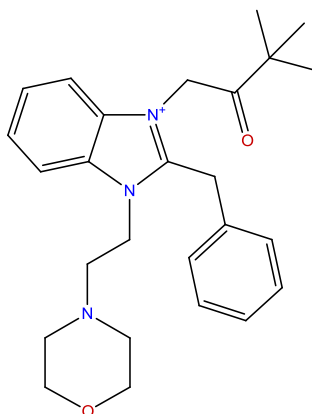
Примечание. <sup>1)</sup> - Ранжирование по возрастанию активности;

<sup>2)</sup> - Ранжирование по убыванию активности.

Было показано, что соединение РУ-539 значительно превосходит по средней ранговой оценке (6,7) остальные изученные соединения (>14,3).

Другие виды анализа *in silico* для производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с антифосфодиэстеразной активностью не проводили, ввиду явного преимущества соединения-лидера. Поэтому оно может рассматриваться как скаффолд.

<sup>1</sup> представлены данные для соединений, изученных на все указанные виды активности.



**Рис. 2.15. Химическая структура соединения РУ-539.**

### **2.5.2. Анализ спектра экспериментальной кардиотонической активности вещества-лидера**

При изучении влияния соединения РУ-539 и амринона на сократительную активность изолированных предсердий крыс было показано дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения. Рассчитаны  $IC_{50}$ , которые представлены в табл. 2.16.

У мышей при внутрибрюшинном введении изучена острая токсичность и рассчитана  $LD_{50}$ . Для оценки широты терапевтического действия на изолированных органах использован терапевтический индекс (табл. 2.16).

Показано, что по влиянию на сократительную активность изолированных предсердий крыс соединение РУ-539 превосходило амрион как по величине  $IC_{50}$  в 6 раз, так и по терапевтическому индексу – в 1,8 раза.

*Таблица 2.16*

**Влияние соединения РУ-539 на сократительную активность изолированных предсердий, острая токсичность ( $LD_{50}$ , внутрибрюшинно, мг/кг) и условный терапевтический индекс (УТИ) исследуемых веществ**

№	Препарат	$IC_{50}$ , М	$ED_{50}$ , мг/кг	$LD_{50}$ , мг/кг	УТИ ( $LD_{50}/ED_{50}$ )
1.	Соединение РУ-539	$4,2 \times 10^{-7}$	0,21	118	561,46
2.	Амрион	$2,5 \times 10^{-6}$	0,47	150*	320,51

\* - по данным Trends in Pharmacological Sciences. [Vol. 1, Pg. 143, 1980.]

### **2.5.3. Заключение**

Среди 60 соединений с антифосфодиэстеразной активностью различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (бензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]-бензимидазолы) найдено соединение РУ-539 - производное бензимидазола с кардиотонической активностью. Механизм его действия связан с блокадой миокардиальной кальмодулиннезависимой ФДЭ. Вещество оказывало дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения, было активнее амринона и превосходило его как по величине IC<sub>50</sub> в 6 раз, так и по терапевтическому индексу – в 1,8 раза.

Структура соединения РУ-539 позиционирована как скаффолд для последующего конструирования новых высокоактивных инотропных веществ.

## **2.6. ПОСТРОЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО СКАФФОЛДА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА**

Представляет интерес выявление в рядах изученных соединений такого скаффолда, который мог бы обеспечивать высокий уровень кардиотропного эффекта в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической), то есть сконструировать интегральный скаффолд, имеющий системный характер действия.

### **2.6.1. Сравнительный анализ скаффолдов, ответственных за проявление антиаритмической, кардиотонической и противоишемической активностей и формирование парных скаффолдов**

Первым этапом системного анализа было проведение попарного сравнения ранее построенных для каждого вида активности скаффолдов. Сравнение позволило выявить общие структурные признаки, которые являются основой для формирования парного (интегрального) скаффолда (на рисунках они выделены красным цветом).

В результате сравнения скаффолдов соединений с *высокой антиаритмической и*

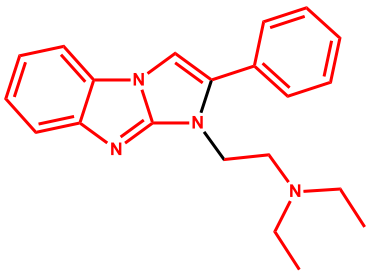
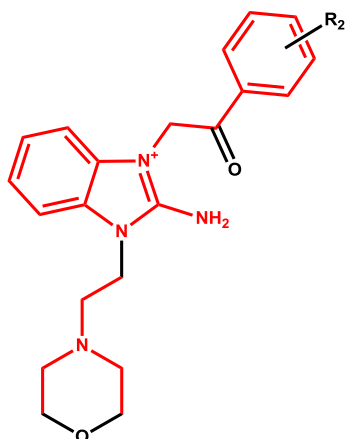
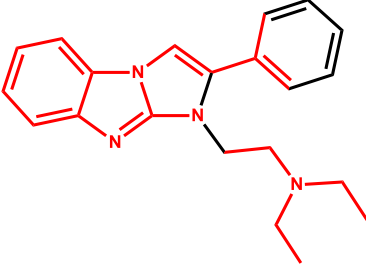
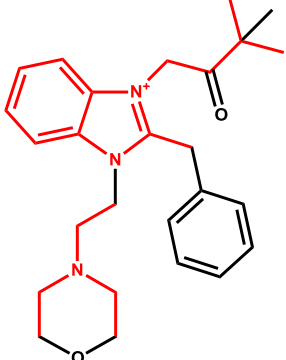
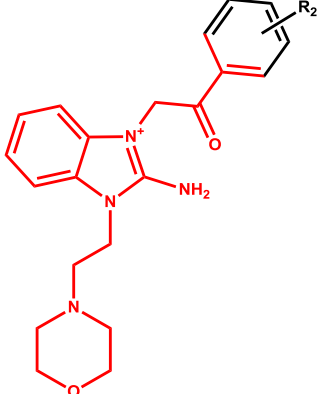
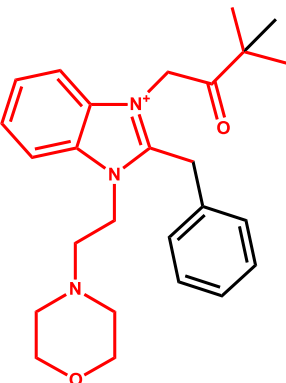
*NHE-ингибирующей активностями* удалось выделить несколько общих структурных фрагментов. Часть из них являются конформационно жесткими (ароматические циклы, входящие в сопряженную систему), а часть обладают конформационной подвижностью (как правило, это заместители) (рис. 2.16А.). В отличие от жестких, сопряженных циклических фрагментов, подвижные фрагменты могут позиционироваться в пространстве по-разному. Так, диэтиламиноэтильный фрагмент, находясь в разных положениях в структурах бензимидазола и имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, но изменяя свою конформацию, может взаимодействовать с одними и теми же участками связывания в сайте биомишени.

С другой стороны, фенил, жестко закрепленный в сопряженной системе имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, в фенилкарбоксометильном фрагменте бензимидазольного скаффолда приобретает конформационную подвижность и может принимать такую конформацию, которая будет близка к конформации жесткой боковой цепочки в ИмБИ.

Таким образом, при попарном сравнении ранее выявленных скаффолдов были найдены общие структурные фрагменты. Некоторые из этих фрагментов в силу их конформационной подвижности могут принимать такие же положения в пространстве как и жесткофиксированные. Это касается диэтиламиноэтильного фрагмента и морфолиноэтильного заместителя, а также боковой цепочки в бензимидазоле.

Аналогичная картина наблюдается при сравнении скаффолдов соединений с *высокой антиаритмической и антифосфодиэстеразной активностью* (рис. 2.16Б.). В структурах ИмБИ и БИ присутствуют фрагменты, которые обладают конформационной подвижностью и способны принимать в пространстве такое же положение, как и аналогичные жестко или нежестко закрепленные фрагменты в другой структуре. Ими являются диэтиламиноэтильный фрагмент и боковая цепь в N<sup>3</sup> положении.

При сравнении скаффолдов соединений с *высокой NHE-ингибирующей и антифосфодиэстеразной активностями* наблюдается четкое структурное сходство: в качестве базовой структуры присутствует молекула бензимидазола, в положении N<sup>1</sup> находится морфолиноэтильный заместитель, в N<sup>3</sup> положении есть боковая цепочка (рис. 2.16В.).

 <p><b>амфедазол</b></p>	 <p><b>соединение PY-1355</b></p>
<i>А. для антиаритмической и NHE- активности</i>	
 <p><b>амфедазол</b></p>	 <p><b>соединение PY-539</b></p>
<i>Б. для антиаритмической и антифосфодиэстеразной активности</i>	
 <p><b>соединение PY-1355</b></p>	 <p><b>соединение PY-539</b></p>
<i>В. для NHE-ингибирующей и антифосфодиэстеразной активности</i>	

**Рис. 2.16.** Построение парных скаффолдов для поиска наиболее активных кардиопротекторных соединений (красным и черным цветом обозначены совпадающие и несовпадающие структурные фрагменты, соответственно)

Таким образом, попарное сравнение скаффолдов соединений с высокой антиаритмической, NHE-ингибирующей и антифосфодиэстеразной активностями позволяет сформировать парные скаффолды, которые обеспечивают одновременное

проявление двух видов кардиотропного действия. Сопоставляя результаты попарного сравнения, необходимо подчеркнуть, что полученные обобщенные скаффолды являются характеристиками системными. То есть, они отражают не оптимальное влияние структуры химических соединений на уровень конкретной фармакологической активности, а сцепленности этих видов активности между собой посредством общей химической структуры, характерной для высокоактивных соединений.

### **2.6.2. Конструирование интегрального скаффолда кардиопротекторной активности в ряду производных бензимидазолов**

Логическим завершением является сопоставление скаффолдов трех видов активностей с целью выявить общий интегральный, системный скаффолд, обеспечивающий проявление одновременно высокого уровня всех трех видов кардиопротекторной активности. Данный скаффолд будет отражать взаимоотношение трех видов активности между собой, опосредованных общей химической структурой.

Системные связи реализуются через существование общего системного интегрального скаффолда. Классическим примером являются адренергические вещества. Независимо от того, на какой тип рецептора они действуют и какие физиологические эффекты при стимуляции соответствующих адренорецепторов развиваются, все структуры имеют общий фрагмент - фенилалкиламин. Другим примером являются серотонинергические средства. Большинство лигандов всех 7 семейств серотониновых (5-НТ) рецепторов имеют общий скаффолд в виде ароматического фрагмента серотонина с присоединенными заместителями различной длины. При этом незначительные модификации в цепочках заместителей могут существенно изменять селективность к 5-НТ-рецепторам, а также уровень фармакологического действия вплоть до инверсии эффекта [Спасов, 2013а]. Среди кардиотропных препаратов и соединений примером являются 10-диалкиламиноацильные производные фенотиазина, у которых преобладание антиангинальных или антиаритмических свойств зависит от заместителя во 2-м положении [Каверина, 1984].

В наших исследованиях при сопоставлении всех трех полученных скаффолдов между собой действительно удалось получить интегральный системный скаффолд (рис. 2.17), детерминирующий высокий уровень кардиопротекторного действия,

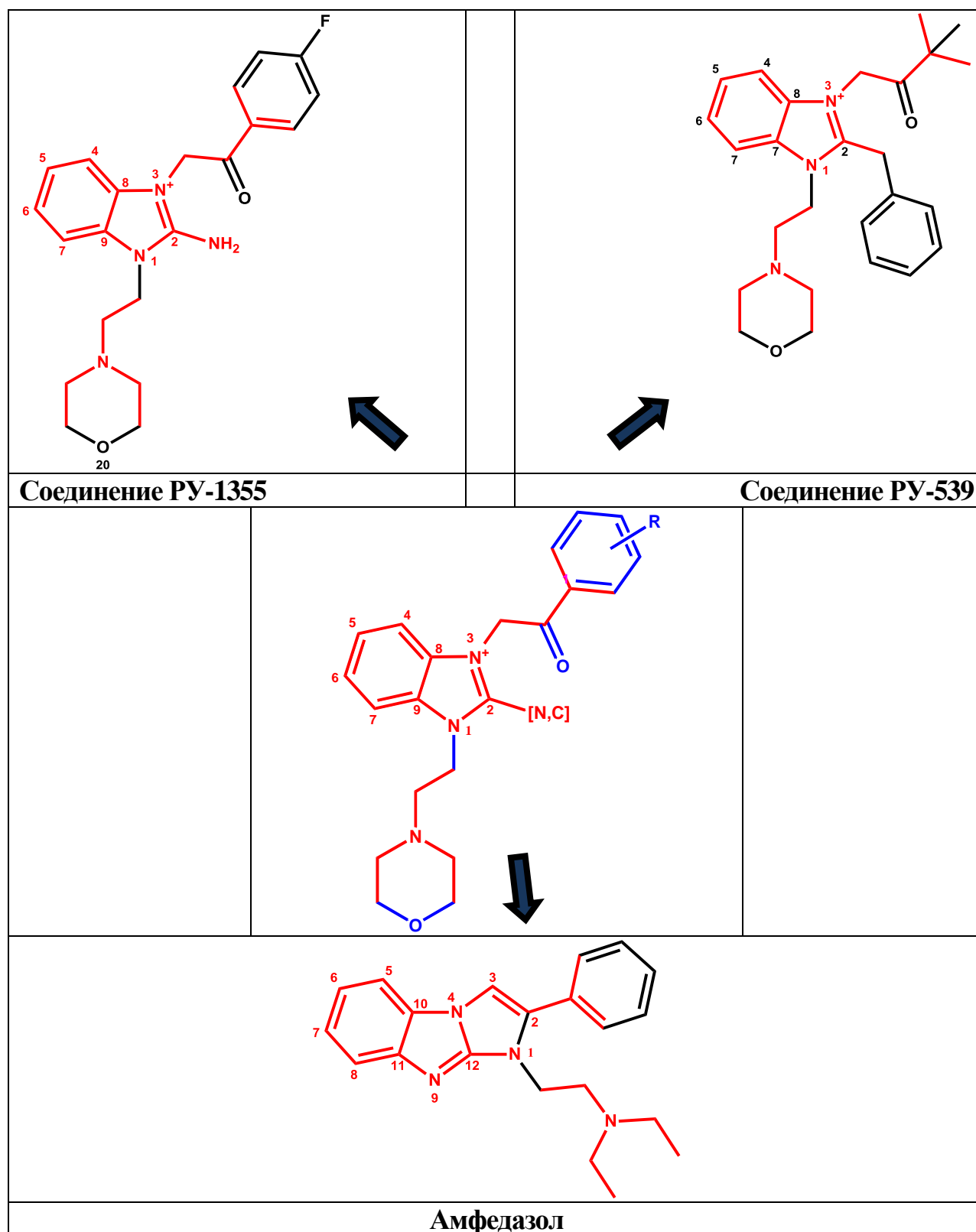


Рис. 2.17. Генеральный скаффолд в структурах наиболее активных соединений с высокой антиаритмической, противоишемической и кардиотонической активностью (красным, синим и черным цветом обозначены совпадающие, частично совпадающие и несовпадающие структурные фрагменты, соответственно).



применительно к антиаритмической, противоишемической и кардиотонической активностям. Общая базовая структура представлена структурой бензимидазола, модифицированного либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей.

## 2.7. АНАЛИЗ СПЕКТРА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ-ЛИДЕРОВ *IN VITRO*

При сравнительной оценке влияния соединений-лидеров производных бензимидазола *in vitro* на виды активности, релевантные кардиопротекторной, были получены результаты, представленные в табл. 2.17.

Таблица 2.17

### Кардиопротекторная активность соединений лидеров *in vitro*

№	Вещество	Виды активности		
		Влияние на рефрактерность миокарда (продолжительность эффективного рефрактерного периода) изолированных предсердий крыс (МЭК, моль/л)	Влияние на активность NHE-1 тромбоцитов ( $1 \times 10^{-8}$ моль/л)	Влияние на сократительную активность изолированных предсердий крыс ( $1 \times 10^{-6}$ моль/л)
1.	Амфедазол	$1,6 \times 10^{-5}$	$37,68 \pm 10,78$	$11,41 \pm 9,56$
2.	Соединение РУ-539	$3,0 \times 10^{-4}$	$56,67 \pm 16,05$	$63,23 \pm 10,36$
3.	Соединение РУ-1355	$1,8 \times 10^{-4}$	$70,93 \pm 7,99$	$25,06 \pm 11,76$
4.	Амиодарон	$1,7 \times 10^{-4}$	—	—
5.	Зонипорид	—	$48,06 \pm 7,09$	—
6.	Амринон	—	—	$27,9 \pm 8,66$

Обозначения: "-" - не изучали.

Соединения РУ-539 и РУ-1355 ограничивали усвоение навязанного ритма изолированными предсердиями в умеренноактивных концентрациях ( $MЭК > 1,04 \cdot 10^{-4}$  М), то есть не проявили выраженного действия в отношении эффективного рефрактерного периода. Согласно кластеризации соединения РУ-539 и амфедазол могут быть отнесены к классам с умеренно- и низкоактивным NHE-ингибирующим эффектами соответственно. Было показано, что амфедазол не влиял на сократимость изолированных предсердий. Соединение РУ-1355 оказало эффект подобно амринону и значительно уступало кардиотоническому действию соединению РУ-539.

Таким образом было показано, что найденные соединения-лидеры проявляют умеренновыраженные эффекты других классов кардиопротекторных соединений. Наличие данных видов активности может быть связано с общностью химического строения и наличия структурных компонентов, ответственных за высокий уровень кардиотропного эффекта в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической).

## **2.8. ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ФАРМАКОФОРНЫХ ФРАГМЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

С целью выявления фрагментов скаффолда, ответственных за возможное фармакофорное взаимодействие с биомишенью, был проведен фармакофорный анализ соединений с высокими антиаритмическим, NHE-1-ингибирующим и антифосфодиэстеразным уровнями активностей (порог значимости  $p < 0,05$ ) с помощью модуля FarmFor (версия 2006 г.) ИТ «Микрокосм» 5.2 (версия 2012).

В результате проведенного анализа соединений с «очень высоким» уровнем антиаритмической активности были выявлены 149 статистически значимых базовых дескрипторов 4-го ранга из которых 15 являются фрагментами структурной формулы соединения-лидера (табл. 2.18). На их основе был построен потенциальный 2D-фармакофор соединений, увеличивающих рефрактерность изолированных предсердий крыс, среди исследованных нами конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола.

Таблица 2.18

**Потенциальные 2D-фармакофоры соединений, обладающих высокими уровнями активности, релевантных кардиопротекторной**

№	Активность		Значимые признаки наличия активности (дескрипторы 4 ранга)		Потенциальные 2D-фармакофоры
	Вид	уровень	Всего, n	Присутствие в лидерах, n	
1.	ННE-1-ингибирующая (соединение РУ-1355)	высокий	4	3	
2.	Антиаритмическая (амфедазол)	очень высокий	149	15	
3.	Антифосфодиэстеразная (соединение РУ-539)	очень высокий и высокий	67	19	
4.	Интегральный скаффолд кардиопротекторной активности	-	-	-	

Обозначения: красным, синим и черным цветом обозначены совпадающие, частично совпадающие и несовпадающие структурные фрагменты скаффолдов, соответственно; потенциальные 2D-фармакофоры выделены для соединений-лидеров - сиреневым цветом, для интегрального скаффолда кардиопротекторной активности – зеленым.

У соединений с «высоким» уровнем NHE-1-ингибирующей активности были выявлены 4 статистически значимых базовых дескриптора 4-го ранга из которых 3 являются фрагментами структурной формулы соединения-лидера (табл. 2.18). На их основе был построен предполагаемый 2D-фармакофор соединений с высокой NHE-1-ингибирующей активностью.

При оценке соединений, имеющих «очень высокий» и «высокий» уровни антифосфодиэстеразной активности, так же были выявлены значимые признаки наличия и отсутствия эффекта. Выявлены 67 базовых дескрипторов 4-го ранга из которых 19 являются фрагментами структурной формулы соединения-лидера (табл. 2.18), построен потенциальный 2D-фармакофор.

Таким образом, выявлены QL-дескрипторы 4-го ранга, которые могут быть ответственны за проявление высокой кардиопротекторной активности. Эти дескрипторы являются фрагментами структурных формул, поэтому при их совмещении получен тот фрагмент интегрального скаффолда, который может быть ответственным за фармакофорное взаимодействие.

Можно предположить, что интегральный скаффолд есть суперпозиция возможных фармакофорных фрагментов исследованных соединений по трем различным видам активностей, релевантных кардиопротекторной.

## 2.9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сопоставлении данных, полученных при проведении подструктурного анализа влияния типа базовой структуры и заместителей на высокие уровни активности, анализа по средним и супремальным оценкам, ранговым исследованиям были выявлены и уточнены некоторые общие и частные закономерности между химическим строением и биологической активностью производных бензимидазола.

В результате экспериментального и виртуального скрининга 468 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы;  $N^1$ -бензимидазолы; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]-бензимидазолы,  $N^4$ -

пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы), увеличивающих рефрактерность изолированных предсердий крыс, был определена перспективная базовая структура для создания целевого скаффолда соединений с высокой антиаритмической активностью. Ей является структура бензимидазола, модифицированная путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей. Производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола оказались наиболее перспективными как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на модификацию. Данные соединения могут быть отнесены к принципиально новому высоко активному классу ( $M\acute{E}K < 3,74 \cdot 10^{-5} M$ ) антиаритмических соединений, способных увеличивать продолжительность рефрактерного периода. Базовая структура N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности с большой широтой терапевтического действия, поскольку этот признак является статистически высокосignимым как для уровня активности «очень высокая», так и для уровня «высокая».

Выявлены значимые заместители (в положениях C<sup>2</sup> - фенил; N<sup>1</sup> - диэтиламиноэтил) и построен интегральный скаффолд высокоактивных соединений. Соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (амфедазол) максимально соответствует как по вычислительным (содержит целевой скаффолд), так и по экспериментальным оценкам ( $M\acute{E}K = 1,5 \cdot 10^{-5} M$ , выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия) «обобщенному образу» активного антиаритмического соединения.

В результате экспериментального скрининга 60 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (N<sup>1</sup>-замещенные 2-аминобензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы) был определена перспективная базовая структура для создания целевого скаффолда соединений с высокой NHE-ингибирующей активностью - 2-аминобензимидазол. Выявлен значимый заместитель в положении N<sup>1</sup> (R<sub>3</sub>) (морфолиноэтильный) и построен интегральный скаффолд высокоактивных соединений.

Соединение РУ-1355 максимально соответствует как по вычислительным (содержит целевой скаффолд), так и по экспериментальным оценкам *in vitro* ( $IC_{50}=5,42 \times 10^{-10} M$ ) и *in vivo* (кардиопротекторное действие на модели ишемии/реперфузии) «обобщенному образу» активного противоишемического соединения.

В результате экспериментального скрининга 60 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов (бензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы) найдено соединение РУ-539 - производное бензимидазола с кардиотонической активностью. Вещество имеет значительное преимущество перед другими соединениями, как по ранговой, так и по экспериментальной оценке *in vitro* ( $IC_{50}=4,2 \times 10^{-7} M$ ) и соответствует «обобщенному образу» активного кардиотонического соединения. Структура этого соединения может рассматриваться как скаффолд.

При попарном сравнении ранее выявленных скаффолдов найдены общие структурные фрагменты. Они отражают не оптимальное влияние структуры химических соединений на уровень конкретной фармакологической активности, а сцепленности этих видов активности между собой посредством общей химической структуры, характерной для высокоактивных соединений.

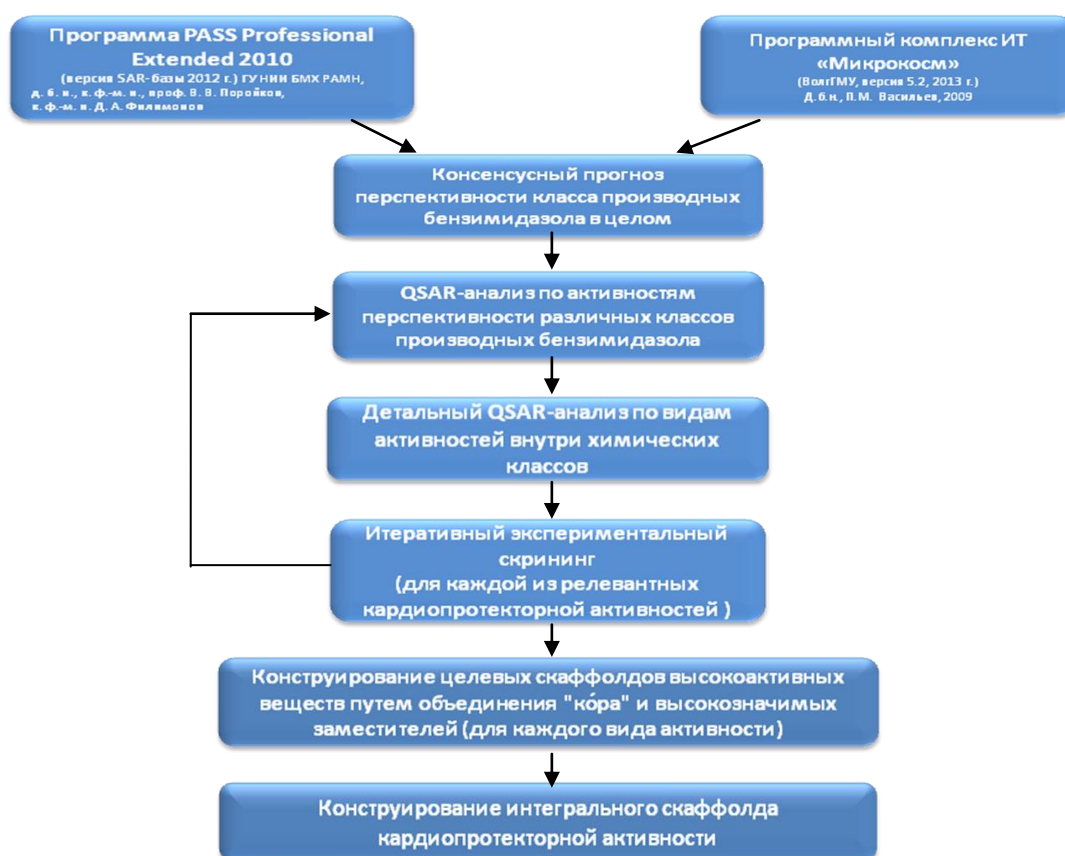
Построен системный интегральный скаффолд, который отражает взаимоотношение антиаритмической, противоишемической и кардиотонической активностей между собой. Общая базовая структура представлена структурой бензимидазола, модифицированного либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей.

Проведенный системный анализ взаимоотношений трех видов кардиопротекторной активности: антиаритмической, противоишемической и кардиотонической, заключающийся в выявлении системного интегрального скаффолда, детерминирующего высокий уровень кардиопротекторной активности, показал, что такой скаффолд существует, и он был построен. Найденный интегральный скаффолд

может быть использован как мощный инструмент создания новых кардиотропных веществ в ряду конденсированных и неконденсированных производных БИ, обладающих высокой кардиотропной активностью и сбалансированных по уровню трех изучаемых видов активности.

Выявлены потенциальные 2D-фармакофоры соединений, обладающих высокими уровнями активности, релевантных кардиопротекторной, которые являются фрагментами интегрального скаффолда и могут быть ответственными за взаимодействие с биомишенями.

Таким образом, предложенная иерархическая система поиска позволяет перевести направленный поиск новых кардиопротекторных соединений в классе конденсированных и неконденсированных производных БИ на качественно новый уровень - на уровень системного поиска веществ, комплексно нормализующих работу сердечно-сосудистой системы (рис. 2.18).



**Рис. 2.18. Иерархическая система поиска новых кардиопротекторных соединений.**

### ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С NHE-1-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

В основе генеза повреждения кардиомиоцитов целого ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы лежит снижение рН внутриклеточной среды и развитие «кальциевого парадокса». Эти изменения, обусловленные различными этиологическими факторами, приобретают важное патогенетическое значение и нередко являются определяющими для прогноза заболевания. В связи с этим, естественным является стремление оказать корригирующее влияние на нарушенный метаболизм кардиомиоцитов [Михин, 2009; Симоненко, 2011].

В последние годы в качестве возможного физиологического и патофизиологического фактора в механизмах развития таких последствий ишемического и реперфузионного стресса, как аритмии, нарушения сократительной функции и гибель клетки рассматривают сарколеммный  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник 1 изоформы (NHE-1) [Писаренко, 2004].

Его биологическая роль связана с такими процессами, как обмен ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ ; регуляция рН и объема клетки; рост, гипертрофия, дифференцировка; повреждение клетки при ишемии; организация цитоскелета и клеточная миграция [Slepков, 2007; Fliegel, 2009; Wakabayashi, 2013].

NHE1 содержит 815 аминокислот. N-терминальный мембранный домен, состоящий из 12 трансмембранных сегментов, обеспечивает транспорт ионов, а С-терминальный цитоплазматический домен является внутриклеточным регулятором активности обменника [Avkiran, 2003; Malo, 2006; Luo1, 2007; Fliegel, 2008, 2009]. Важное значение в ионном транспорте и восприимчивости к фармакологическому ингибированию имеют IV, VII, IX трансмембранные сегменты. Кроме того могут быть включены в выполнение функций NHE1 связанные с мембраной петли: IL2 (внутриклеточная петля 2), IL4 и EL5 (внеклеточная петля 5). NHE1 регулируется путем фосфорилирования различными киназами (ERK 1/2 (внеклеточные регулируемые киназы 1 и 2), MAP (митоген активизируемая протеинкиназа), p90rsk (p90 рибосомальная киназа s6), Rho-связанная киназа (ROCK), p160ROCK, Nck-взаимодействующая киназа (NIK),



CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин зависимая киназа II) [Зверев, 2003; Malo, 2006; Slepков, 2007; Koliakos, 2008]) и взаимодействием с другими белками клетки.

Активация NHE связана с рядом разнообразных последовательных событий, включая клеточную пролиферацию. Эпидермальный фактор роста (EGF) и ангиотензин II (AT II) активируют NHE1, усиливают клеточный рост и дифференциацию. В миокарде этот путь ведет к развитию гипертрофии. В некоторых типах клеток NHE1 может играть определенную роль в механизмах апоптоза [Baumgartner, 2004; Karmazyn, 2008; Garcarena, 2009]. NHE1 также важен в организации цитоскелета и миграции [Stock, 2006]. В некоторых типах клеток NHE1 локализуется в ламеллиподиях, где их С-терминальный цитоплазматический хвост действует как якорь для актиновых филаментов через связь с белками эзрином, радиксином и моезином (ERM белки). Нарушение цитоскелетного соединения путем мутации структурных компонентов или путем ингибирования активности NHE1 предотвращает процессы фокальной адгезии и тормозит клеточную миграцию. Кроме того, клетка утрачивает способность контролировать форму. То есть, NHE1 может действовать как мембранный структурообразующий каркас, связывающий вместе множество белков, давая им возможность к функциональному взаимодействию.

Таким образом, NHE-обменники вовлечены во множество сложных физиологических и патологических процессов, включающих регуляцию клеточного pH, клеточную миграцию, апоптоз [Slepков, 2007; Schelling, 2008], гипертрофию [Malo, 2006; Cingolani, 2011; Fliegel, 2011; Wakabayashi, 2013], повреждения, связанные с ишемией и реперфузией [Писаренко, 2004, 2005; Allen, 2003; Andreadou, 2008], эндотелиальную дисфункцию, а так же такие заболевания, как сахарный диабет и его осложнения [Балаболкин, 2001, 2003; Дедов, 2006; Schelling, 2008], сердечная недостаточность [Cingolani, 2007, 2011], нарушение мозгового кровообращения [Luo1, 2007], развитие злокачественных опухолей [Malo, 2006].

Наибольший интерес представляет использование ингибиторов NHE1 в фармакологической защите сердца. Основные положительные эффекты NHE ингибиторов на ишемизированный миокард в экспериментальных и клинических исследованиях связаны с улучшением восстановления сократительной функции левого желудочка после реперфузии; сокращением зоны ишемии и некроза; уменьшением

выраженности нарушения ионного гомеостаза, сопровождающего ишемию/реперфузию; редуцированием апоптоза, уменьшением частоты возникновения и тяжести аритмий, вызванных ишемией/реперфузией.

В соответствии с международной базой данных Thomson Reuters Integrity известно 481 вещество - ингибитор NHE [Электронный ресурс]. Многократно подтвержденные в эксперименте кардиопротекторные свойства ингибиторов NHE1 позволили начать клинические исследования у 6 соединений [Зверев, 2003; Thomson Reuters Integrity, 2011; Karmazyn, 2013].

Предполагаемый спектр возможного клинического применения включает профилактику риска инфаркта миокарда у больных с нестабильной стенокардией; пациентов с острым инфарктом миокарда, у которых кровоток в поврежденной зоне восстанавливали с помощью ангиопластики; при проведении операций по замене аортального клапана или аортокоронарного шунтирования; для сохранения ультраструктуры и восстановления функции донорских сердец при использовании консервирующих растворов [Писаренко, 2004; Karmazyn, 1999, 2013].

Наиболее активным NHE ингибитором является зонипорид [Guzman-Perez, 2001; Tracey, 2003]. Клинические испытания препарата проводились фирмой «Pfizer» у больных с инфарктом миокарда, заболеваниями коронарных сосудов, атеросклерозом. Однако были выявлены неврологические расстройства, подтвержденные в исследованиях на животных [Pettersen, 2008]. Поэтому риск повреждения периферической нервной системы может ограничивать дозу и применение данного препарата.

Ранее (глава 2.4.) в исследованиях *in silico*, *in vitro* и *in vivo* было найдено соединение РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид. Оно оказывает NHE-ингибирующее действие на тромбоцитах кролика ( $IC_{50}=5,42 \times 10^{-10}$  М) и по терапевтическому индексу превосходит препарат сравнения зонипорид в 6 раз (табл. 2.12). При изучении противоишемического действия в условиях *in vivo* было показано, что соединение РУ-1355 оказывает кардиопротекторное действие на модели длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс. Вещество снижает тяжесть ишемического повреждения миокарда, уменьшает зону некроза, снижает содержание тропонина I. Для расширения представления о его кардиопротекторных свойствах необходимо было

изучить влияние соединения РУ-1355 на сократительную активность и функциональные резервы миокарда в условиях хронической сердечной недостаточности, а так же его антифибрилляторные свойства.

### 3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования *in vivo* проводились в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств [Галенко-Ярошевский, 2012] и кардиотонической активности лекарственных средств [Тюренков, 2012].

Исследования проводили на белых неинбредных крысах: 96 самцах массой 280-450 г и 50 самках массой 220-300 г. Условия содержания и проведения исследований более подробно описаны в главе 2.1. Все эксперименты были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года).

Влияние соединений **на развитие и тяжесть экспериментальных нарушений ритма** ишемического генеза изучали на моделях длительной и кратковременной ишемии. Все исследования проводили в условиях наркоза (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии. Лигатуру подводили на 2 мм ниже от края левого ушка предсердия под общим стволом левой коронарной артерии.

*Длительную ишемию миокарда* моделировали у крыс-самок (n=38) (ООО «Питомник РАМГН», ветеринарное свидетельство 250 № 0453089 от 16.03.2013) весом 260-300 грамм путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА) в течение 60-ти минут с последующей 60-тиминутной реперфузией. Соединение РУ-1355 (1,12 мг/кг) и зонипорид (1 мг/кг) вводили в эквимолярных дозах внутривенно за 10 минут до реперфузии. Тяжесть аритмий оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов - нет нарушений ритма; 1 - единичные экстрасистолы, синусовые тахи- и брадикардии; 2 - множественные экстрасистолы, блокады; 3 - пароксизмальная тахикардия, электромеханическая диссоциация; 4 - фибрилляция, асистолия [Цорин, 2004].

Антифибрилляторный эффект *при кратковременной ишемии миокарда* изучали у крыс-самцов (n=42) (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН, ветеринарное свидетельство 250

№ 0309472 от 08.04.2012 г.) весом 380–450 грамм. Ишемию проводили в течение 7 минут с последующей 5-ти минутной реперфузией. Вещества вводили за 5 минут до ишемии в дозах 1,12; 2,5; 5,0 мг/кг для соединения РУ-1355 и 1 мг/кг для зонипорида. Наличие эффекта оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов - отсутствие, 1 – наличие лечебного действия. За отсутствие лечебного эффекта принимали возникновение фибрилляций желудочков, приступов пароксизмальной тахикардии, брадикардию 50% и более от исходных данных. Рассчитывали  $ED_{50}$  – эффективная доза, в 50% случаев предотвращающая возникновение фибрилляций сердца.

Изучение влияния соединений на *порог электрических фибрилляций* желудочков [Крыжановский, 2010] проводили на крысах-самцах (n=18) (наркоз: уретан 1,3 г/кг, внутривенно)<sup>1</sup> (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН, ветеринарное свидетельство 250 № 042261 от 17.12.2012 г.) весом 380–450 грамм. Электрическую стимуляцию осуществляли серией из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности (длительность стимула - 4 мсек, частота -50 имп/сек) с помощью имплантированных в миокард левого желудочка на расстоянии 0,5 см друг от друга двух позолоченных электродов электростимулятором HSE Stimulator II (Hugo Sach Elektronik, Германия). При помощи 4-канального осциллографа фирмы Elema-Siemens (Швеция) проводили визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента. За порог электрической фибрилляции желудочков принимали минимальную силу тока, вызывающую при двукратном повторении фибрилляцию желудочков. Порог определяли до и через 5 минут после введения вещества с интервалом тестирующих импульсов 2-3 минуты. Кроме того, определяли время до восстановления нормального ритма. Соединение РУ-1355 (в дозе, равной  $ED_{50}$  на модели постреперфузионных аритмий - 1,25 мг/кг) и зонипорид (1 мг/кг) вводили однократно внутривенно.

Изучение влияния соединений на *основные параметры электрокардиограммы* (ЭКГ) проводили у intactных крыс-самок (n=12) (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН,

---

<sup>1</sup> Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам НИИ фармакологии им. Закусова РАМН (Москва) д.м.н. С.А. Крыжановскому, к.м.н. В.Н. Столяруку, д.б.н. И.Б. Цорину за консультации по проведению исследования.

ветеринарное свидетельство 247 № 0111207 от 18.12.2013 г.) весом 220-250 грамм в условиях наркоза (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно). Оценивали продолжительность P, PQ, QRS, QT, QT<sub>c</sub>, RR в секундах, высоту R в мВ, ЧСС уд/мин. Соединение РУ-1355 вводили внутривенно в возрастающих дозах 1,25; 2,5; 5,0 мг/кг.

В качестве **препарата сравнения** в исследованиях, описанных выше, использовали зонипорид (SIGMA, США) в дозе 1 мг/кг однократно внутривенно. В качестве контроля вводили растворитель (изотонический раствор натрия хлорида) в эквивалентных объемах.

Во всех сериях исследований регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ) производили во II стандартном отведении на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия) или электрокардиографе ЭК 4Т-02 (Россия).

**Кардиопротекторные свойства** изучали на модели хронической изопротереноловой интоксикации, приводящей к гипертрофии миокарда и последующей хронической сердечной недостаточности (ХСН) по методам, описанным [Ennis, 2003; Shibata, 2011]. Патологию моделировали внутривенным введением L-изопротеренола (Sigma-Aldrich, США) по 2,5 мг/кг 2 раз в сутки в течение 4 недель.

Исследования проводили на беспородных крысах-самцах (n=36) (ООО «Питомник РАМТН», ветеринарное свидетельство 250 № 0453089 от 16.03.2013) массой 280-400 г. Животные были разделены на 6 групп: 1 группа – «интактные» - животные, которым вводили физиологический раствор в течение всего периода наблюдения (внутривенно, 0,1 мл на 100 г веса) (n=6); 2 группа – «изопротеренол» - животные контрольной группы с изопротереноловой (ИЗО) ХСН (n=6); 3 группа – «ИЗО+РУ-1355, 1,25 мг/кг» - животные с ХСН, которым вводили соединение РУ-1355 внутривенно за 3 суток до начала периода введения изопротеренола и в течение последующих 4 недель 1 раз в сутки в дозе 1,25 мг/кг (в дозе, равной ЕД<sub>50</sub> на модели постреперфузионных аритмий) (n=6); 4 группа – «ИЗО+РУ-1355, 5 мг/кг» - животные с ХСН, которым вводили соединение РУ-1355 внутривенно за 3 суток до начала периода введения изопротеренола и в течение последующих 4 недель 1 раз в сутки в дозе (в 4 раза превышающей ЕД<sub>50</sub> на модели постреперфузионных аритмий) 5 мг/кг (n=6); 5 группа – «ИЗО+милдронат» - животные с ХСН, которым вводили милдронат (АО «Гриндекс», Латвия) в дозе 50 мг/кг внутривенно за 3 суток до начала периода введения

изопротеренола и в течение последующих 4 недель 1 раз в сутки (n=6); 6 группа – «ИЗО+предуктал» - животные с ХСН, которым вводили триметазидин в форме Предуктал® МВ (Сервье ЗАО (Россия)) перорально за 3 суток до начала периода введения изопротеренола и в течение последующих 4 недель 1 раз в сутки в дозе 25 мг/кг (n=6).

В условиях наркоза (хлоралгидрат («Panreас», Испания), внутривенно, 400 мг/кг), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии проводили катетеризацию левого желудочка. Изучение влияния вещества на функциональные резервы сердца осуществлялось с использованием нагрузочных проб [Меерсон, 1984; Тюренков, 1981, 2005, 2012]: *изменение преднагрузки* - нагрузки объемом – быстрое, в течение 2 сек., внутривенное введение животным физиологического раствора из расчета 0,3 мл/на 100 г массы тела; *изменение постнагрузки* - максимальной изометрической нагрузки – пережатие восходящей части дуги аорты на 30 сек. Регистрация основных показатели кардио- и гемодинамики (максимальное левожелудочковое давление (ЛЖД<sub>макс</sub>), скорости сокращения и расслабления миокарда (dp/dt+ и dp/dt-), частота сердечных сокращений (ЧСС)) осуществлялась электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт.ст.) с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Москва, Россия). Максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) определяли расчетным способом (ЛЖД<sub>макс</sub>×ЧСС/(масса левого желудочка + 1/3 межжелудочковой перегородки)).

После проведения нагрузок выделяли левый желудочек и межжелудочковую перегородку и взвешивали. Часть тканей левого желудочка забирали для проведения морфологических исследований.

Уровень малонового диальдегида (МДА) изучали в тканях сердца в тесте с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Андреева, 1988]. Оптическую плотность верхней фазы определяли на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 535 нм.

В качестве маркера повреждения миокарда оценивали содержание тропонина I в плазме крови (пкг/мл) крыс (набор реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (CUSABIOBIOTECHCO., LTD. Китай) на универсальном микропланшетном

ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США).

Для сравнительной оценки повреждения миокарда проводили морфологические исследования образцов сердец<sup>1</sup>. Часть тканей левого желудочка фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (ООО «МоДиТех» Казань, Россия). Через 48 часов образцы тканей обезвоживали и заливали в парафин (гомогенизированная парафиновая среда (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме «Sakura» (Japan), срезы депарафинизировали, регидратировали, окрашивали: 1) гематоксилином и эозином (ООО «МоДиТех» Казань, Россия), 2) по Массону (ООО «МоДиТех» Казань, Россия) (включает применение четырех различных красителей: железного гематоксилина Вейгерта, пикриновой кислоты, смесь кислых красителей для цитоплазмы и анилиновый синий) [Вайль, 1947; Меркулов, 1969; Саркисов, 1996].

Для объективной сравнительной оценки структурных изменений в сердце в условиях эксперимента определяли степень выраженности площадей очагов формирования соединительной ткани (объемная плотность) и образование коллагеновых волокон при окраске тканевых срезов по Массону в баллах: 0 - незначительная, 1 - слабовыраженная/незначительная, 2 - слабовыраженная, 3 - умеренновыраженная, 4 - выраженная, 5 - сильновыраженная. Использование полуколичественных морфологических методов было продиктовано, прежде всего, необходимостью сравнения структурных изменений в нескольких группах, а также тем, что изменения тканевых и внутриклеточных компонентов в миокарде при увеличении или уменьшении функциональной нагрузки на сердце носят, в основном, количественный характер [Page, 1971, 1972; Richter, 1974; Shay, 1975].

Гистологические препараты документировали цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10.

Проводили расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $\bar{M}$ , стандартная ошибка средней

---

<sup>1</sup> - Выражаем благодарность и глубокую признательность зав. кафедрой патологической анатомии ВолгГМУ, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

арифметической  $m$ ).  $ED_{50}$  на модели кратковременной ишемии/реперфузии рассчитывали с помощью программы «Graph.Pad.Prism.5.0», США.

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Проверку выборки на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили с помощью непараметрического парного теста Вилкоксона. Сравнение трех и более независимых выборок проводили параметрическим (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна) и непараметрическим (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна) методами. Сравнение трех и более зависимых выборок проводили непараметрическим методом Фридмана с посттестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

### **3.2. АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355**

Аритмии представляют собой одну из форм повреждения миокарда. В раннюю 1a (первые 10 минут) фазу ишемии нарушения ритма возникают по механизму повторного вхождения возбуждающего импульса (*re-entry*). Это связано с замедлением в зоне ишемии деполяризации кардиомиоцитов. В раннюю 1b (последующие 10-60 минут) и позднюю фазы ишемии, а также при реперфузии развитие аритмий происходит не только по механизму *re-entry*, но и при участии эктопического автоматизма [Нарыжная, 2012].

Поэтому были изучены антиаритмические свойства соединения РУ-1355 и зонипорида на моделях как длительной, так и кратковременной ишемии/реперфузии.

#### **3.2.1. Антиаритмическое действие соединения РУ-1355 при длительной ишемии/реперфузии миокарда**

На модели 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией при перевязке левой коронарной артерии у животных развивались признаки ишемического повреждения миокарда: подъемы сегмента ST (более подробно динамика подъема сегмента ST описана в главе 2.4.6. (таблица 2.12) и снижение амплитуды зубца R. Регистрировали наджелудочковые и желудочковые нарушения ритма, которые были переведены в балльную систему.



Во всех экспериментальных группах нарушения ритма в ишемический период составили в среднем 2,14 балла (табл. 3.1). В период реперфузии у животных контрольной группы произошло утяжеление форм развивающихся аритмий как на раннем (через 5 минут), так и на позднем (через 60 минут) этапах. Тяжесть нарушений ритма составила 2,42 балла.

При введении соединения РУ-1355 за 10 минут до реперфузии наметилась тенденция к снижению тяжести аритмии. При балльной оценке аритмий, возникших в реперфузионный период, к концу периода наблюдения выраженность нарушений статистически достоверно снизилась на 53% по отношению к контролю (табл. 3.1).

После введения зонипорида так же наметилась тенденция к уменьшению тяжести аритмии. К 60-й минуте показатель статистически достоверно снизился на 48% по отношению к контролю (табл. 3.1).

Таким образом, было показано, что соединение РУ-1355 на модели длительной ишемии/реперфузии миокарда оказывает антиаритмический эффект, подобный зонипориду.

### **3.2.2. Антифибрилляторный эффект соединения РУ-1355 на модели кратковременной ишемии/реперфузии миокарда**

У всех животных после перевязки ствола левой коронарной артерии на ЭКГ во II стандартном отведении наблюдали проявления ишемии и повреждения миокарда. В контрольной серии исследований фибрилляции желудочков развивались после реперфузии у 86,67% животных (табл. 3.2).

При внутривенном введении зонипорида в дозе 1 мг/кг за 5 минут до ишемии тяжелые нарушения ритма развились лишь в 28,57% случаев.

Соединение РУ-1355 в эквимольной зонипориду дозе (1,12 мг/кг) уступало ему по способности ограничивать развитие тяжелых нарушений ритма, которые развивались в 66,67% случаев. При увеличении дозы профилактический эффект усиливался. ЕД<sub>50</sub> соединения РУ-1355 в данной серии опытов оказалась равной 1,25 мг/кг.

Таким образом, соединение РУ-1355 при однократном внутривенном введении показало антиаритмическую активность при введении его как до периода ишемии, так и перед реперфузией.

Таблица 3.1

**Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на тяжесть нарушений ритма на этапах 60-ти минутной ишемии с последующей 60-ти минутной реперфузией миокарда у крыс при однократном внутривенном введении**

**(баллы,  $M \pm m$ )**

№	Вещество	n	Доза, мг/кг	исход	Ишемия <sup>1</sup> , мин			Реперфузия, мин		
					5	30	60	5	30	60
1.	Контроль	12	-	0,58±0,23	2,17±0,11 <sup>*</sup>	2,08±0,15 <sup>*</sup>	2,33±0,14 <sup>*</sup>	2,59±0,15 <sup>*</sup>	2,25±0,13 <sup>*</sup>	2,42±0,15 <sup>*</sup>
2.	Зонипорид	14	1,0	0,64±0,20	2,14±0,18 <sup>*</sup>	2,07±0,17 <sup>*</sup>	2,07±0,17 <sup>*</sup>	2,00±0,15 <sup>*#</sup>	1,93±0,20 <sup>*</sup>	1,64±0,20 <sup>*#</sup>
3.	Соединение РУ-1355	12	1,12	0,58±0,23	2,25±0,25 <sup>*</sup>	2,17±0,21 <sup>*</sup>	2,08±0,26 <sup>*</sup>	1,92±0,29 <sup>*</sup>	1,83±0,24 <sup>*</sup>	1,58±0,26 <sup>*#</sup>

Примечания:

Различия статистически значимы по сравнению с: <sup>\*</sup> - исходом своей группы (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ), <sup>#</sup> - контролем патологии (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Время введения вещества 50 минут от начала ишемии (за 10 минут до реперфузии).

Таблица 3.2

**Антифибрилляторный эффект соединения РУ-1355 у крыс на модели 7-ми минутной ишемии миокарда с последующей реперфузией ( $M \pm m$ )**

№	Вещество, доза, мг/кг	n	Предотвращение фибрилляций желудочков в	
			%	баллах <sup>1</sup>
1.	Физиологический раствор, 0,1 мл/100 г веса	15	13,33	0,13±0,09
2.	Соединение РУ-1355, 1,12 мг/кг	6	33,33	0,33±0,23
3.	Соединение РУ-1355, 2,5 мг/кг	8	87,50	0,88±0,13*
4.	Соединение РУ-1355, 5 мг/кг	6	100,00	1,00±0,00*
5.	Зонипорид, 1 мг/кг	7	71,43	0,71±0,20*

Примечание: \* - различия статистически значимы по отношению к контролю, получавшему физиологический раствор (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0.05$ ).

### **3.2.3. Влияние соединения РУ-1355 на порог электрических фибрилляций лабораторных животных**

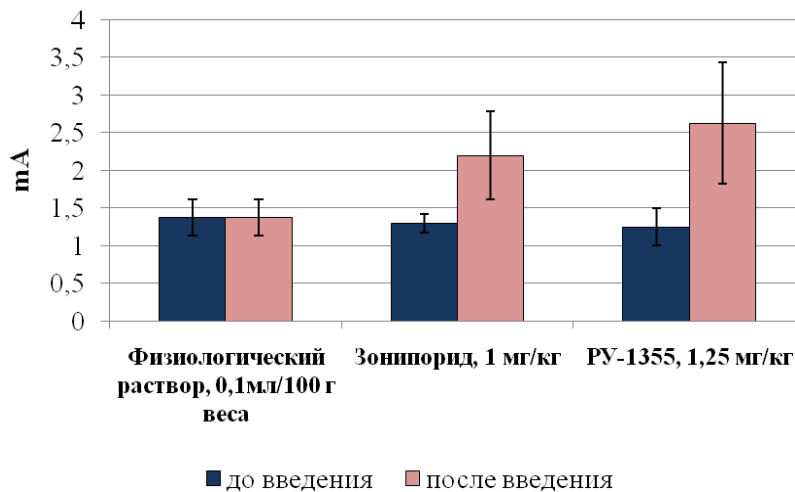
Порог фибрилляций в условиях ишемии миокарда снижается. При этом многие антиаритмические препараты в условиях ишемии увеличивают риск профибрилляторного действия [Моисеев2, 2010б, 2012б-г; Нарыжная, 2012]. Поиск соединений с антифибрилляторными свойствами остается актуальной задачей. В период электрических стимуляций не происходит полноценного сокращения желудочков сердца, что приводит к развитию кратковременного ишемического повреждения, а, следовательно, к активации натрий-водородного обменника [Hashimoto, 2003; Karmazyn, 2002]. Поэтому, исходя из предварительно полученных данных, на следующем этапе было изучено влияние соединения РУ-1355 на порог фибрилляций.

У контрольной группы животных до и после введения физиологического раствора порог возникновения и продолжительность фибрилляций не изменились (рис. 3.1).

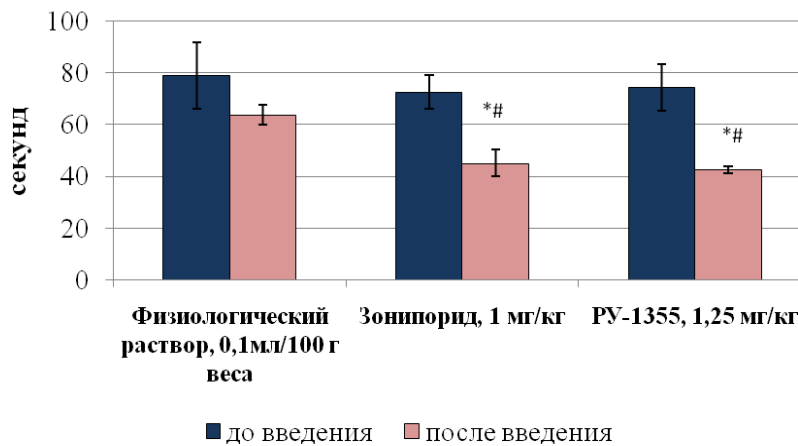
При введении соединения РУ-1355 порог электрических фибрилляций увеличился по отношению к исходу на 110,4%, по отношению к контролю на 90,6% (рис. 3.1). При этом время до восстановления нормального ритма статистически достоверно сократилось как по отношению к исходным величинам, так и к контролю на 42,8 и 33,3% соответственно.

<sup>1</sup> Из расчета 0 баллов – нет эффекта; 1 балл – есть эффект.

### А. Порог фибрилляций



### Б. Продолжительность фибрилляций



**Рис. 3.1. Влияние соединения РУ-1355 и зонипорида на изменение порога (А) и продолжительности (Б) электрических фибрилляций желудочков при однократном внутривенном введении**

Примечания: \* - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными своей группы (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ); # - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

Порог электрических фибрилляций при введении зонипорида увеличился по отношению к исходу - на 69,23%, по отношению к контролю на 60,0% (рис. 3.1). Время до восстановления нормального ритма сократилось по отношению к исходным и контрольным показателям на 37,85 и 29,41% соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, было показано, что соединение РУ-1355 обладает антифибрилляторными свойствами и превосходит зонипорид по способности

увеличивать порог электрических фибрилляций на 20%. По возможности сокращать время до восстановления нормального ритма соединение оказывает эффект, сравнимый с действием препарата сравнения.

#### **3.2.4. Действие соединения РУ-1355 на электрокардиограмму**

Поскольку NHE является электронейтральной системой, ее ингибирование непосредственно не затрагивает сердечную электрическую деятельность. Поэтому, косвенно показать отсутствие влияния ингибитора натрий-водородного обменника на потенциалзависимые каналы проводящей системы возможно, изучив изменения на ЭКГ.

При оценке влияния зонипорида при однократном внутривенном введении в дозе 1 мг/кг на основные параметры ЭКГ наркотизированных крыс статистически значимых изменений не обнаружено (табл. 3.3). Выявлена тенденция к увеличению продолжительности зубца Р и интервала PQ и, соответственно, снижению ЧСС. Это свидетельствует о возможной задержке проведения возбуждения по предсердиям при введении зонипорида.

Соединение РУ-1355 в дозе, равной  $ED_{50}$  при кратковременной ишемии (1,25 мг/кг), не оказывало влияние на основные параметры ЭКГ наркотизированных крыс (табл. 3.4). При повышении дозы наблюдалось увеличение продолжительности зубца Р, интервала PQ, комплекса QRS и, соответственно, снижение ЧСС (в дозе 8,75 мг/кг  $p < 0,05$ ), что может быть связано с угнетением внутрипредсердного, суправентрикулярного и внутрижелудочкового проведения в дозах, превосходящих эффективную антифибрилляторную.

Подобные свойства ингибиторов NHE описаны в литературе [Hashimoto, 2003]. Так, хотя карипорид не влияет на параметры ЭКГ, показано, что, влияя на рефрактерный период предсердий и подавляя его укорочение, он купирует фибрилляции предсердий у собак, вызванные стимуляцией предсердий.

#### **3.2.5. Заключение**

В экспериментах на животных были показаны антиаритмические и антифибрилляторные свойства ингибитора NHE-1 соединения РУ-1355. Данный эффект наблюдается как при введении до, так и в период ишемии.

Таблица 3.3

**Влияние зонипорида на основные параметры ЭКГ наркотизированных<sup>1</sup> крыс  
при однократном внутривенном введении в дозе 1 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Вещество	Показатель							
	P, сек.	PQ, сек.	QRS, сек.	QT, сек.	QTс, сек.	R, мВ	RR, сек.	ЧСС, уд/мин
Исход	0,025 $\pm$ 0,002	0,047 $\pm$ 0,003	0,027 $\pm$ 0,002	0,071 $\pm$ 0,002	0,190 $\pm$ 0,004	0,200 $\pm$ 0,035	0,139 $\pm$ 0,006	433,00 $\pm$ 17,57
Зонипорид	0,027 $\pm$ 0,002	0,049 $\pm$ 0,001	0,026 $\pm$ 0,002	0,077 $\pm$ 0,002	0,201 $\pm$ 0,008	0,220 $\pm$ 0,042	0,150 $\pm$ 0,010	404,80 $\pm$ 27,15

Примечания: \* - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными (непараметрический парный тест Вилкоксона,  $p > 0,05$ )

Таблица 3.4

**Влияние соединения РУ-1355 на основные параметры ЭКГ наркотизированных<sup>1</sup> крыс  
при внутривенном введении в возрастающих дозах ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Суммарная доза	Показатель							
	P, сек.	PQ, сек.	QRS, сек.	QT, сек.	QTс, сек.	R, мВ	RR, сек.	ЧСС, уд/мин
Исход	0,024 $\pm$ 0,001	0,052 $\pm$ 0,003	0,026 $\pm$ 0,002	0,074 $\pm$ 0,003	0,199 $\pm$ 0,005	0,275 $\pm$ 0,055	0,136 $\pm$ 0,005	443,25 $\pm$ 15,00
1,25 мг/кг	0,024 $\pm$ 0,001	0,054 $\pm$ 0,002	0,030 $\pm$ 0,004	0,073 $\pm$ 0,005	0,195 $\pm$ 0,010	0,325 $\pm$ 0,029	0,138 $\pm$ 0,005	438,00 $\pm$ 17,37
3,75 мг/кг	0,024 $\pm$ 0,002	0,065 $\pm$ 0,005	0,027 $\pm$ 0,001	0,076 $\pm$ 0,004	0,198 $\pm$ 0,008	0,300 $\pm$ 0,047	0,148 $\pm$ 0,005	407,25 $\pm$ 13,37
8,75 мг/кг	0,029 $\pm$ 0,002	0,068 $\pm$ 0,002*	0,039 $\pm$ 0,002*	0,086 $\pm$ 0,008	0,211 $\pm$ 0,013	0,275 $\pm$ 0,029	0,165 $\pm$ 0,012*	368,50 $\pm$ 23,66*

Примечания: \* - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ )

<sup>1</sup> хлоралгидрат 400 мг/кг внутрибрюшинно

Соединение статистически достоверно в 2 раза снижает выраженность постреперфузионных нарушений ритма при длительной ишемии и предотвращает развитие фибрилляции желудочков при кратковременной ишемии ( $ED_{50}$  равна 1,25 мг/кг); увеличивает порог электрических фибрилляций желудочков на 110,4% и сокращает время до восстановления ритма на 42,8%.

Статистически достоверных изменений на ЭКГ при однократном введении соединения РУ-1355 в эффективной дозе не выявлено.

### **3.3. КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

При внутрибрюшинном введении изопротеренола в низких дозах длительным курсом происходит развитие гипертрофии миокарда. Это связано с тем, что хроническая стимуляция симпатической нервной системы малыми дозами вызывает активацию различных факторов роста, таких как ангиотензин II, трансформирующий фактор роста  $\beta_1$ , инсулиноподобный фактор роста и др. [Шляхто, 2005; Osadchii, 2007а,б; Takaki, 2012]. Эндотелин-1, норэпинефрин, различные факторы роста стимулируют соответствующие рецепторы и активируют NHE1, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации натрия в кардиомиоцитах. Это, в свою очередь, либо напрямую, либо через протеинкиназу C активирует ядерные факторы транскрипции, кроме того повышает уровень внутриклеточного кальция через  $3Na^+-Ca^{2+}$ -обменник и посредством замедления удаления кальция из цитоплазмы. Рост внутриклеточной концентрации кальция приводит к активации факторов, стимулирующих гипертрофию (кальцийневрин, CaMKII), повышает проницаемость митохондриальной мембраны за счет открытия пор MPT (mitochondrial permeability transition pores), что способствует ремоделированию митохондрий. Позднее усиливается продукция свободных радикалов, что вместе с действием активированных факторов транскрипции вызывают гипертрофию миокарда [Karmazyn, 2008; Takaki, 2012].

Поэтому при изучении эффектов соединений у животных с гипертрофией миокарда необходимо учитывать влияние не только на сократительную активность, но и на маркеры повреждения и продукты перекисного окисления липидов.

Таким образом, оценку влияния изучаемых соединений на формирование

сердечной недостаточности, вызванной хроническим введением ИЗО (2,5 мг/кг 2 раза в день, 31 день) проводили по следующим показателям: сократительной активности в условиях функциональных нагрузок, уровню ТнІ и МДА, морфологическим изменениям в тканях сердца.

### **3.3.1. Сократительная активность соединения РУ-1355**

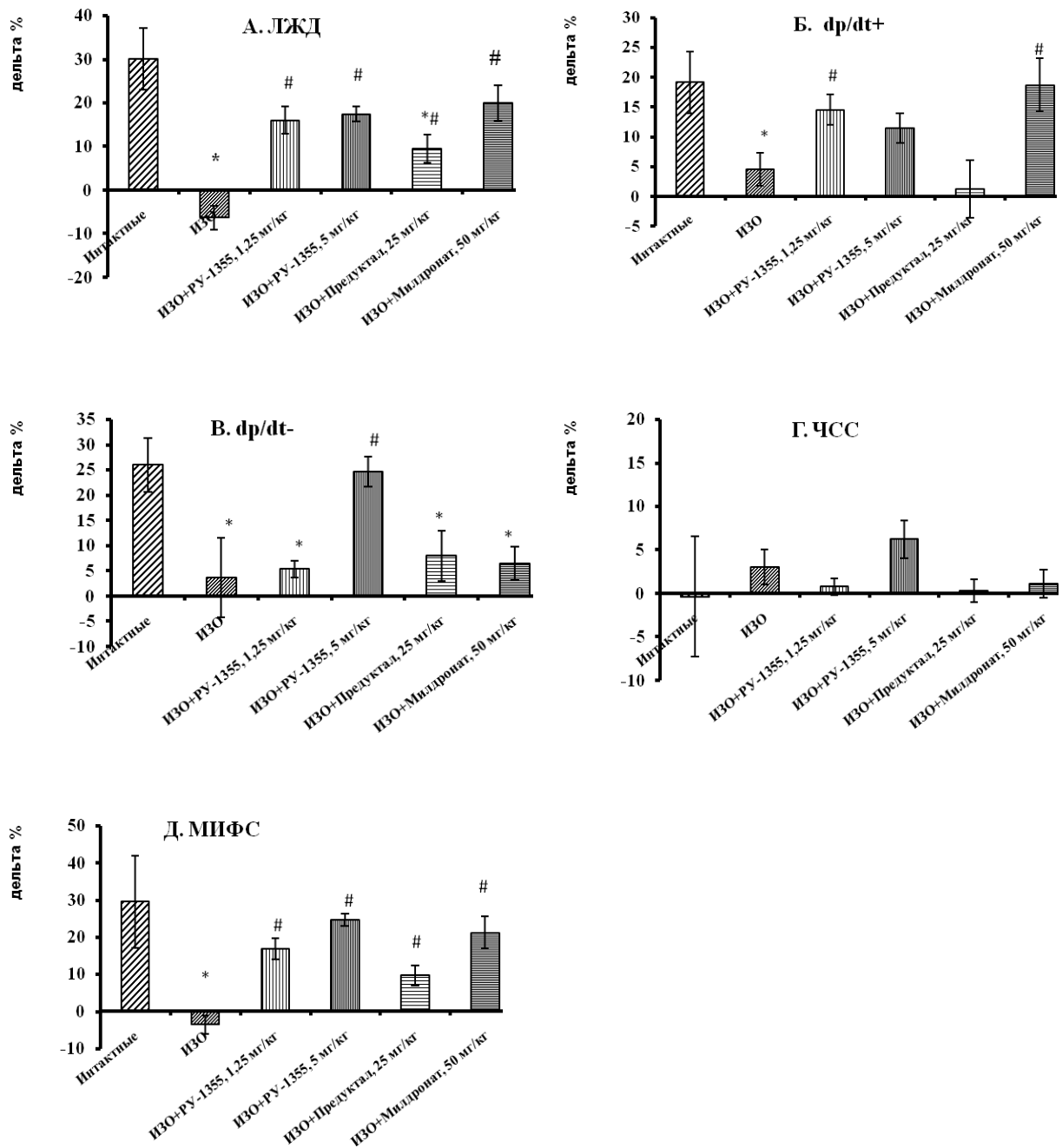
Сократительная активность у животных с изопротереноловой гипертрофией миокарда в обычных условиях может не только не снижаться, но и усиливаться [Osadchii, 2007а,б], однако нарушаются функциональные резервы. Для определения степени их сохранности проводят тесты с увеличением пред- и постнагрузки.

У животных с хроническим изопротереноловым повреждением миокарда, получавших на фоне введения ИЗО предуктал, (группа 5) исходные показатели сократимости (ЛЖД,  $dp/dt$ -) статистически значимо на 25,2% превосходили таковые интактных (приложение 13, 17). У остальных животных с ХСН (группы 2-4, 6) сократительная активность не отличалась от интактной группы (приложение 13-16, 18), однако наблюдался более низкий уровень ЧСС и ИФС. Так, у крыс контрольной группы с ХСН выявлено статистически значимое снижение ЧСС и ИФС на 12,0 и 29,6%. У животных, получавших соединение РУ-1355 и милдронат, наблюдали тенденции к повышению ИФС по отношению к группе ХСН.

Повышение **преднагрузки** у интактных животных вызвало подъем ЛЖД максимально на 15 секунде на 30,0%, скорости сокращения ( $dp/dt$ +) – на 19,2%, скорости расслабления ( $dp/dt$ -) миокарда – на 26,0% по сравнению с исходными данными (приложение 13, рис. 3.2А-В). ЧСС при этом практически не изменялась. Максимальный относительный прирост интенсивности функционирования структур (МИФС) составил около 30% (рис. 3.2Г-Д).

У животных контрольной группы с изопротереноловой ХСН при увеличении преднагрузки гемодинамическая реакция практически отсутствовала. Максимальный прирост основных показателей кардиодинамики животных с патологией (ЛЖД,  $dp/dt$ +,  $dp/dt$ -, МИФС) был статистически достоверно ниже чем у интактных животных в 5,8, 4,2, 7,2 и 8,3 раза соответственно (приложение 14, рис. 3.2А-Д).





**Рис. 3.2. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на максимальные показатели кардиодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом**

Примечание: различия, статистически значимы (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению: \* - к интактным животным, # - к группе «ИЗО». Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «изопротеренол» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза/день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+предуктал», «ИЗО+милдронат»- группы животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день)

При проведении нагрузки объемом животным с ХСН, которым на фоне ИЗО вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня, сократимость миокарда улучшалась. Максимальный прирост ЛЖД составил 16,0% на 15-ой секунде ( $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе) (приложение 15, рис. 3.2А). ЧСС не изменялась (рис. 3.2Г.). Прирост МИФС составил 16,9% ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.2Д). Максимальные приросты  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  были выше чем у контрольных в 3,2 и 1,5 раза соответственно, но не были статистически значимы.

При увеличении курсовой дозы вводимого соединения РУ-1355 до 5 мг/кг/сутки на фоне ИЗО сократимость миокарда в условиях проведения нагрузки так же улучшалась: ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , ЧСС, МИФС возросли максимально на 15-ой секунде наблюдения на 17,4; 11,5; 24,6; 6,2; 24,6% (приложение 16, рис. 3.2). В отношении ЛЖД,  $dp/dt-$ , МИФС различия с контрольной группой животных с ХСН были статистически значимы. Установлено, что при увеличении дозы соединения РУ-1355 наблюдается значимый рост  $dp/dt-$  и МИФС в 4,6 и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными, получавшими меньшую дозу.

При исходно высоких показателях сократимости в условиях проведения нагрузки объемом животным с ХСН, получавшим на фоне ИЗО предуктал (25 мг/кг/сутки) в течение 31 дня, показатели сократимости миокарда возросли незначительно: максимальный прирост ЛЖД на 15-ой секунде составил 9,4% ( $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе) (приложение 17, рис. 3.2). ЧСС не изменялась. Прирост МИФС составил 9,7% ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.2Д). Приросты показателей  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  были незначительны и незначимы.

У животных с изопротереноловой ХСН, которым вводили милдронат (50 мг/кг/сутки) в течение 31 дня, на 15-ой секунде наблюдения ЛЖД возрастало максимально на 19,9%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 18,6%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 6,5% (приложение 18; рис. 3.2). Показатели ЛЖД и  $dp/dt+$  были статистически значимо выше таковых контрольной группы животных, получавших изопротеренол в 3,3 и 4,1 раза соответственно. Изменений ЧСС практически не было. Прирост МИФС составил 21,2%.

Таким образом, было показано, что при увеличении преднагрузки соединение РУ-1355 (1,25 мг/кг/сутки) при курсовом введении улучшало сократимость сердца животных с хроническим изопротереноловым повреждением миокарда и ХСН, развившейся на его фоне, о чем свидетельствовало увеличение ЛЖД,  $dp/dt+$ , МИФС в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно

( $p < 0,05$ ), в группе животных, получавших вещество, по сравнению с контрольной группой с ИЗО. При увеличении дозы вводимого соединения наблюдался значимый рост  $dp/dt$ - и МИФС в 4,6 и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными, получавшими меньшую дозу.

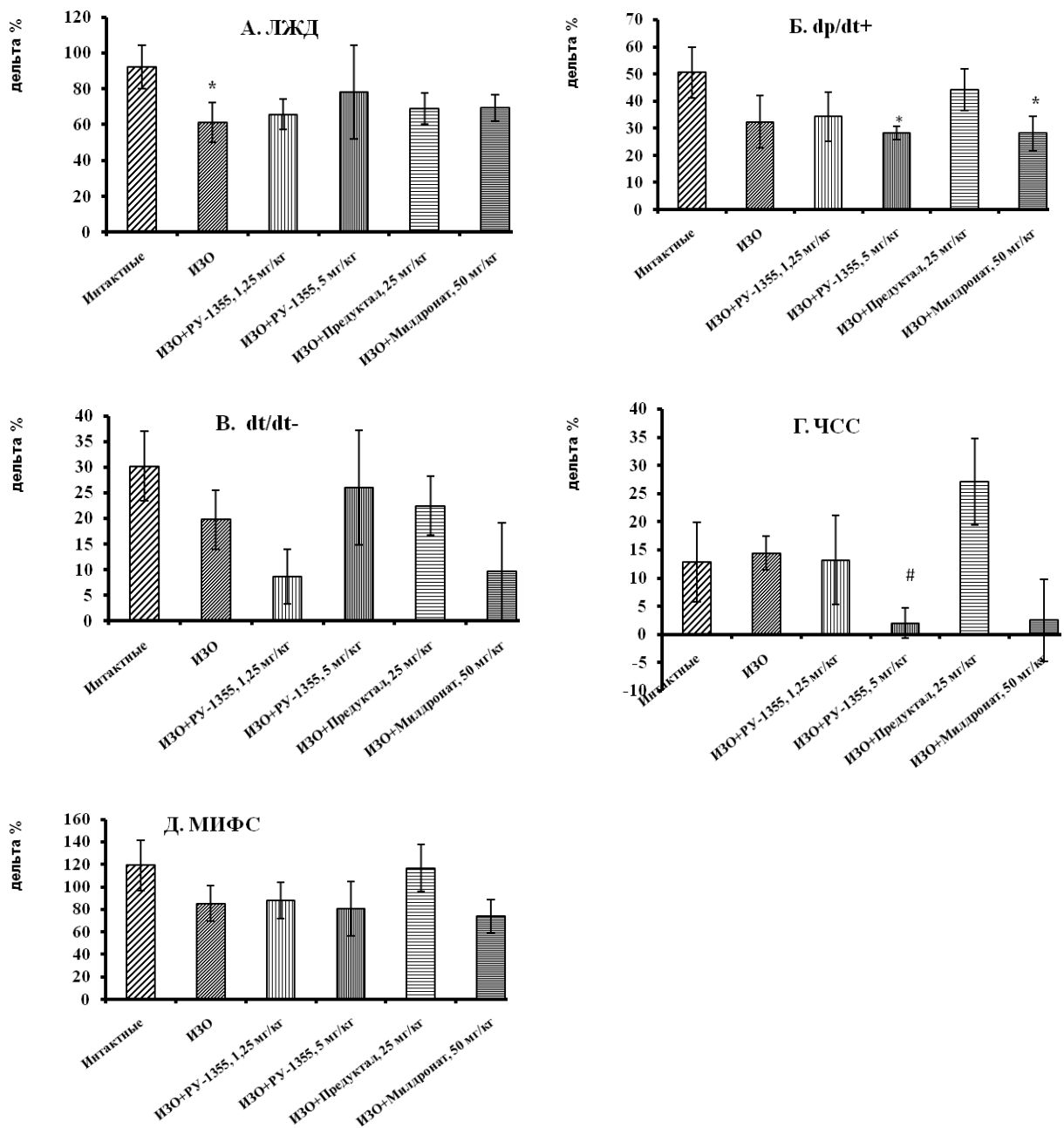
По выраженности действия соединение РУ-1355 оказывало эффект, подобный милдронату, и превосходило предуктал.

Анализ полученных результатов влияния препаратов на кардиодинамику при **изометрической нагрузке** проводили по первичному (на 5 секунде) ответу и способности удерживать ее в течение всего периода наблюдения (площадь под фармакодинамической кривой прироста).

При проведении изометрической нагрузки у животных интактной группы максимальный ответ развивался на 5 секунде: ЛЖД возрастало на 92,3%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) - на 50,6%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда - на 30,2%, ЧСС - на 12,8%, МИФС увеличился на 119,1% по сравнению с исходными данными (рис. 3.3; приложение 19). Эффекты устойчиво сохранялись на протяжении всего периода пережатия аорты. Площади под фармакодинамическими кривыми прироста показателей сократимости были наивысшими среди всех групп (1-6) и составили для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  2295,6; 1046,7 и 717,7 усл. ед.. При этом ЧСС выросла незначительно, площадь под кривой составила 422,6 усл.ед.. МИФС за нагрузку была 2951,0 усл. ед. (максимальный показатель среди всех экспериментальных групп 1-6) (рис. 3.4).

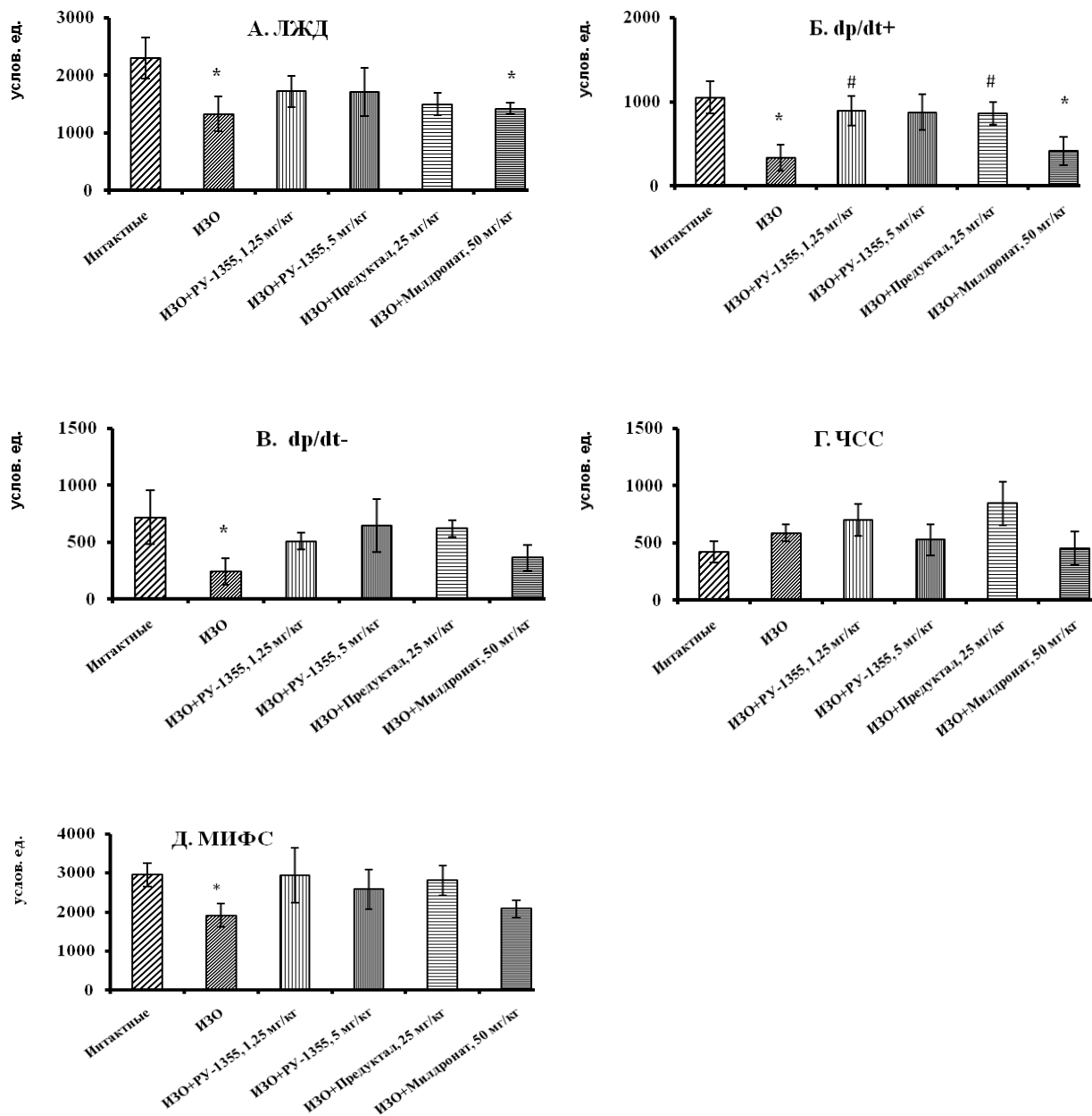
У контрольных животных с ХСН, вызванной длительным введением ИЗО, наблюдалась умеренная реакция на изометрическую нагрузку как по выраженности первичного ответа (рис.3.3-3.4, приложение 20) так, и сохранности сократительной активности. Так, максимальный прирост на 5-ой секунде наблюдения для ЛЖД составил 61,3%, скорости сокращения ( $dp/dt+$ ) – 32,3%, скорости расслабления ( $dp/dt-$ ) – 19,8%, ЧСС - 14,41%, МИФС - 85,4%, что ниже показателей у интактной группы животных на 33,6; 36,2; 34,5; 12,8 и 28,4% соответственно (рис 3.3.А-В, приложение 20).

К концу нагрузки показатели сократимости значительно снизились. Площади под фармакодинамическими кривыми прироста показателей сократимости были минимальными среди всех групп (1-6) и составили для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  1326,01; 332,6 и 242,2 усл. ед., что в 1,7; 3,1 и 3,0 раза ниже, чем у интактных животных ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.3. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на кардиодинамические показатели первичного ответа в тесте максимальной изометрической нагрузки у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом**

Примечание: различия, статистически значимы (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению: \* - к интактным животным, # - к группе «ИЗО». Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «изопротеренол» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза/день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+Предуктал», «ИЗО+Милдронат»- группы животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день)



**Рис. 3.4. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на кардиодинамические показатели при максимальной изометрической нагрузке (прирост площадей под фармакодинамическими кривыми) у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом**

Примечание: различия статистически достоверны (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению к группе: \* - «интактные»; # - «ИЗО».

Обозначения: «интактные» — животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «изопротеренол» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза/день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+Предуктала», «ИЗО+Милдронат»- группы животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день).

При этом ЧСС выросла, площадь под кривой составила 584,03 усл.ед. Площадь под динамической кривой МИФС во время нагрузки была равна 1914,03 усл. ед. (рис. 3.4).

Первичный ответ на постнагрузку у животных, которым на фоне ИЗО вводили соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг, практически не отличался от такового у контрольной группы (рис 3.3., приложение 21). Однако по сохранности сократительной активности в течение всего периода наблюдения (площадь под кривой) превосходило результаты животных с патологией не получавших лечение: ЛЖД на 29,5%,  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  - в 2,7 и 2,1 раза соответственно. МИФС была выше на 53,1% (рис. 3.4).

При увеличении дозы вводимого соединения животным с ИЗО до 5 мг/кг/сутки в условиях нагрузки реакция практически не изменилась как по выраженности первичного ответа (рис.3.3, приложение 22), так и сохранности сократительной активности (рис. 3.4).

Выраженный первичный ответ на максимальную изометрическую нагрузку наблюдался у животных с ХСН, получавших предуктал 25 мг/кг/сутки. Максимальный прирост ЛЖД<sub>макс</sub>,  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  на 5-ой секунде наблюдения составили 69,1; 44,1 и 22,5% соответственно (рис.3.3, приложение 23), на 13,0; 36,9; 13,6% соответственно превосходил показатели контрольной группы с ИЗО. Кардиодинамическая реакция устойчиво сохранялась в течение всей нагрузки и прирост площадей под кривой составил: для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  - 1495,1; 860,1; 619,4 услов. ед. соответственно, что превосходило эффекты контрольной группы животных на 12,8%; в 2,6 и 2,5 раза (рис. 3.4). при этом значительно возросла ЧСС: площадь под кривой составила 845,2 услов. ед.. Площадь под кривой МИФС составила 2804,9 услов.ед..

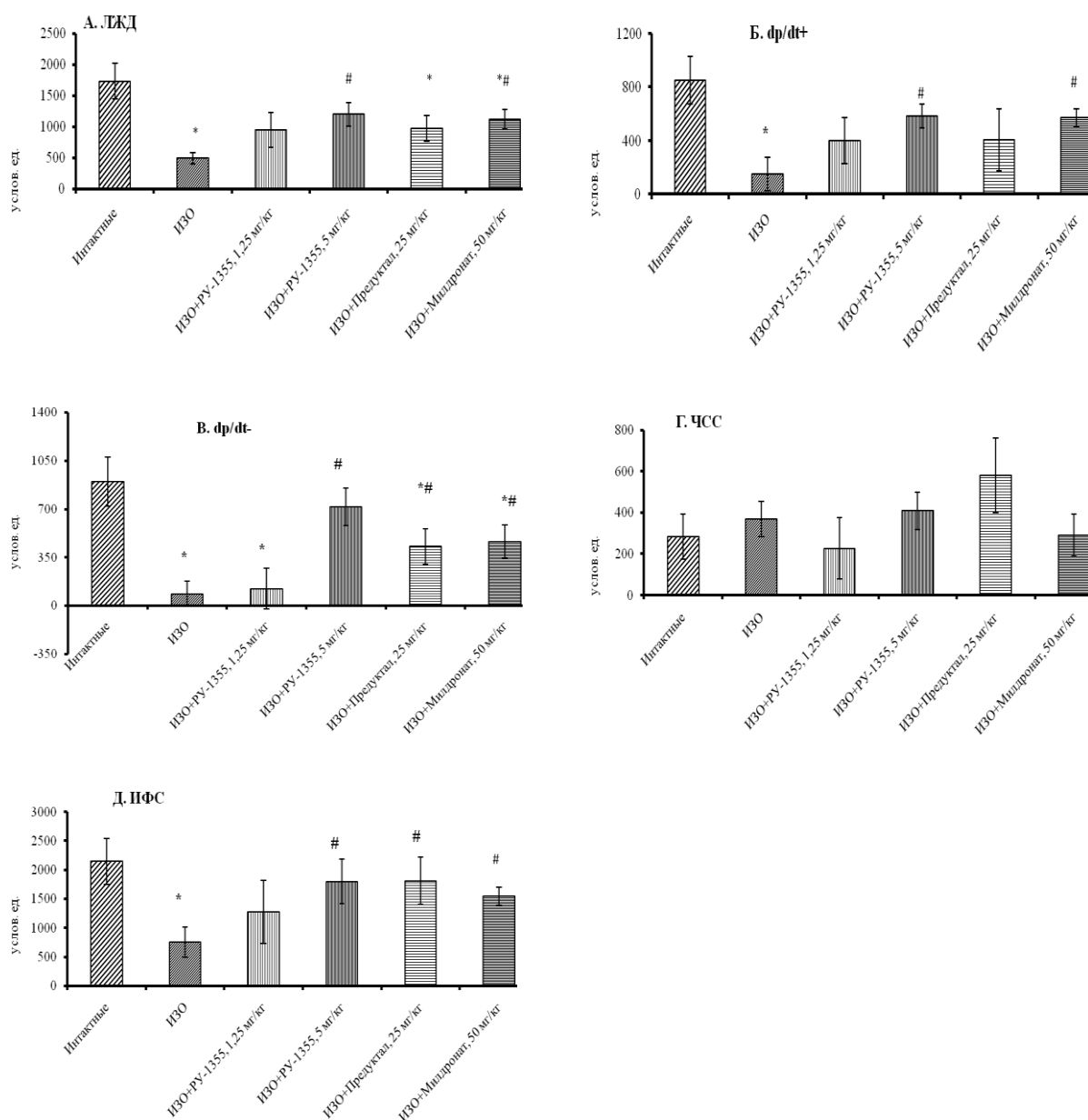
В группе животных с ХСН, получавших на фоне ИЗО милдронат в дозе 50 мг/кг/сутки, первичный ответ при проведении максимальной изометрической нагрузки был не выраженный. Прирост показателей сократимости составил для ЛЖД - 69,6%,  $dp/dt+$  - 28,2%,  $dp/dt-$  - 9,7%, ЧСС - 2,5%, МИФС - 73,9% (рис. 3.3, приложение 24). Показатели прироста ЛЖД превосходили таковые в контрольной группе на 13,5% и уступали по  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , ЧСС, МИФС на 12,7, 50,9, 82,7 и 13,5%, соответственно. Площади под кривыми прироста кардиодинамических показателей были выше для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , МИФС на 7,2; 24,3; 50,4; 8,8%, чем у животных контрольной группы с ХСН (рис. 3.4).

Таким образом, было показано, что при увеличении постнагрузки соединение РУ-1355 (в диапазоне доз 1,25-5,0 мг/кг/сутки) улучшало сократимость миокарда животных с ХСН, вызванной ИЗО, и сохраняло ее на достаточно высоком уровне. По значению площади под фармакодинамическими кривыми прироста скоростей сократимости и расслабления ( $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ ) изучаемое вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки статистически значимо превосходило показатели контрольной группы животных в 2,7 и 2,1 раза. Соединение РУ-1355 в условиях проведения максимальной изометрической нагрузки у животных с изопротереноловой ХСН оказывало эффект подобный предукталу и превосходило милдронат по способности длительно удерживать нагрузку.

По итогам двух нагрузок рассчитана суммарная площадь под кривой прироста эффекта (рис. 3.5). Было показано, что соединение РУ-1355, предуктал и милдронат не только улучшают сократимость миокарда животных с ХСН, вызванной ИЗО, но и статистически значимо сохраняют ее на достаточно высоком уровне, то есть способствуют увеличению функциональных резервов сердца. В дозе 1,25 мг/кг/сутки практически не уступает препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходит их по основным показателям.

### **3.3.2. Влияние соединения РУ-1355 на уровень тропонина I в плазме крови и малонового диальдегида в миокарде**

Оценку тяжести повреждения миокарда проводили по уровню специфического маркера - тропонина I, а так же интенсивности процессов (промежуточному продукту) перекисного окисления липидов (ПОЛ) - по уровню МДА. У животных контрольной группы с ИЗО был показан достоверно высокий уровень **тропонина I** (124,1 пкг/мл) в плазме крови (табл. 3.5). Соединение РУ-1355 при длительном введении на фоне ИЗО статистически значимо ограничивало рост данного показателя. Так, у животных, получавших вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки, наблюдался в 6,9 раза более низкий уровень маркера повреждения тропонина I по отношению к группе «контроль», в дозе 5,0 мг/кг/сутки - в 4,2 раза. В группах животных с ХСН, получавших предуктал 25 мг/кг/сутки и милдронат в дозе 50 мг/кг/сутки, уровень тропонина I в плазме крови был в 3,1 и 2,8 раза ниже, чем у животных с ХСН ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.5. Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на гемодинамические показатели по итогам пред- и постнагрузок (суммарный прирост площадей под фармакодинамическими кривыми) у животных с хронической интоксикацией изопроterenолом**

Примечание: различия статистически достоверны (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению к группе: \* - «интактные»; # - «ИЗО».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «изопроterenолом» - животные, которым вводили изопроterenол в дозе 2,5 мг/кг (2 раза/день (28 дней); «ИЗО+РУ-1355», «ИЗО+Предуктал», «ИЗО+Милдронат»- группы животных с хроническим повреждением миокарда изопроterenолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день).



Таким образом, соединение РУ-1355 в наиболее активной дозе 1,25 мг/кг превосходит предуктал и милдронат по влиянию на снижение уровня тропонина I в плазме крови в 2,2 и 2,5 раза соответственно.

Таблица 3.5

**Влияние соединения РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) при курсовом введении на уровень МДА и тропонина I у крыс с хроническим изопротереноловым повреждением миокарда ( $M \pm m$ )**

№	Группа	МДА, (нМоль/г ткани миокарда)	Тропонин I, (пкг/мл плазмы крови)
1	Интактные	101,07±5,93	1,66±0,67
2	Изопротеренол (ИЗО)	172,41±12,43 <sup>*</sup>	124,10±24,49 <sup>*</sup>
3	ИЗО+соединение РУ-1355, 1,25 мг/кг	100,57±5,67 <sup>#</sup>	17,81±11,77 <sup>#</sup>
4	ИЗО+соединение РУ-1355, 5 мг/кг	89,21±6,74 <sup>#</sup>	29,45±10,03 <sup>*#</sup>
5	ИЗО+предуктал, 25 мг/кг	99,69±7,93 <sup>#</sup>	39,67±10,12 <sup>*#</sup>
6	ИЗО+милдронат, 50 мг/кг	113,57±6,12 <sup>#</sup>	44,12±19,92 <sup>*#</sup>

Примечание: различия уровня тропонина I статистически достоверные (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению к группе: <sup>\*</sup> - «интактные»; <sup>#</sup> - «изопротеренол»; различия уровня МДА статистически достоверные (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению к группе: <sup>\*</sup> - «интактные»; <sup>#</sup> - «изопротеренол».

Обозначения: «интактные» – животные, которым вводили физиологический раствор в дозе 0,1 мл/100 г веса (31 день); «изопротеренол» - животные, которым вводили изопротеренол в дозе 2,5 мг/кг 2 раза/день (28 дней); «ИЗО+соединение РУ-1355», «ИЗО+Предуктал», «ИЗО+Милдронат»- группы животных с хроническим повреждением миокарда изопротеренолом, которым вводили данные соединения в указанных дозах (31 день).

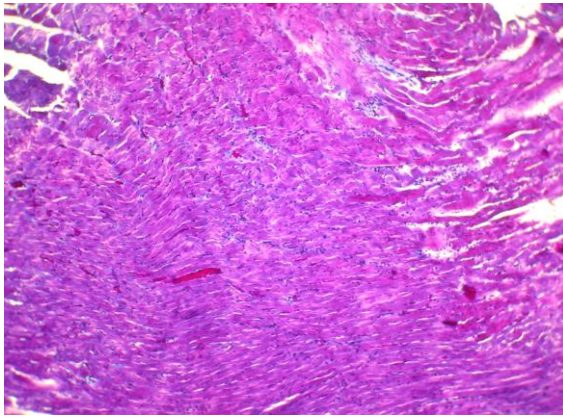
У животных контрольной группы с ИЗО был показан достоверно высокий уровень МДА (172,4 нМоль/г) в ткани миокарда, который превосходил этот показатель у интактных животных в 1,7 раза (табл. 3.5). У животных с ХСН, получавших соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг/сутки, наблюдался в 1,7 раза более низкий уровень МДА по отношению к контрольной группе с ХСН, в дозе 5,0 мг/кг/сутки - в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ). Предуктал и милдронат при длительном введении на фоне ИЗО статистически значимо ограничивали рост данного показателя в 1,7 и 1,5 раза активнее, по сравнению с животными с ХСН ( $p < 0,05$ ). Таким образом, соединение РУ-1355 снижает рост МДА подобно предукталу и милдронату.

### **3.3.3.Эффект соединения РУ-1355 на морфологию миокарда**

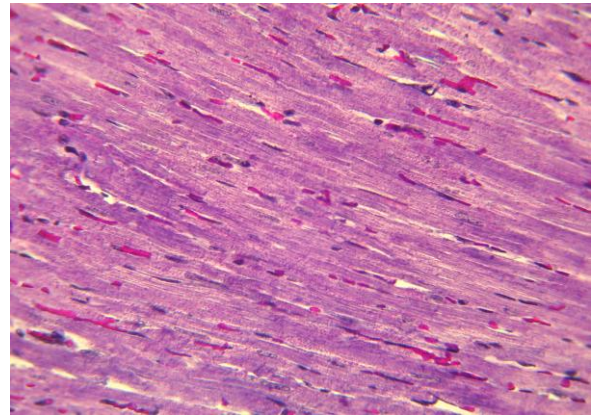
В миокарде крыс контрольной группы преобладали кардиомиоциты, формировавшие мышечные волокна, с равномерно окрашенной ацидофильной цитоплазмой и хорошо выраженной поперечной исчерченностью. Ядра кардиомиоцитов на продольных срезах имели овальную форму, располагались в центре клетки, содержали значительное количество гетерохроматина. Между мышечными клетками обнаруживалось незначительное количество рыхлой волокнистой соединительной ткани с кровеносными капиллярами, что подтверждено при окрашивании парафиновых срезов по Массону. В редких случаях отмечалось наличие единичных лимфоцитов в наружной оболочке мелких артерий в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка (рис. 3.6).

У животных контрольной группы в условиях хронического изопротеренолового (5,0 мг/кг в/бр) повреждения в течение 4 недель обнаруживались дистрофические и атрофические изменения в кардиомиоцитах; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы кардиомиоцитов. Кроме того, в ряде случаев отмечена умеренная гипертрофия значительной части кардиомиоцитов, преимущественно в субэндокардиальных отделах миокарда. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка с переходом в интрамуральный миокард обнаруживались участки зрелой фиброзной соединительной ткани с формированием полей фиброза. В миокарде между участками фиброзной ткани обнаруживался сетчатый фиброз и дистрофические измененные резко атрофичные кардиомиоциты. Участки фиброзирования обнаруживались также в периваскулярных отделах миокарда левого желудочка. При окраске по Массону в очагах фиброза обнаруживалось значительное количество коллагеновых волокон, а также разрастание фиброзной ткани богатой коллагеновыми волокнами между кардиомиоцитами папиллярных мышц. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как выраженная. Морфологическая картина свидетельствует о ярко выраженном фиброзе миокарда (рис. 3.6).

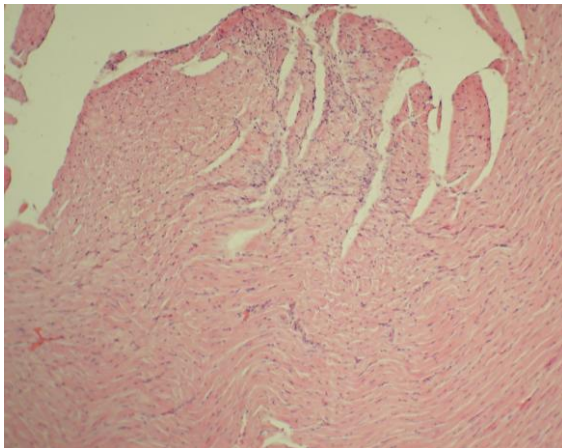
В миокарде крыс с ХСН, которым на фоне ИЗО вводили соединение РУ-1355 дозе 1,25 мг/кг в течение 31 дня, отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация цитоплазмы.



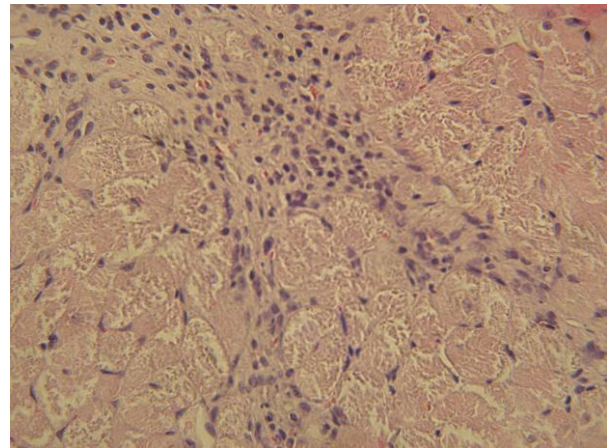
а



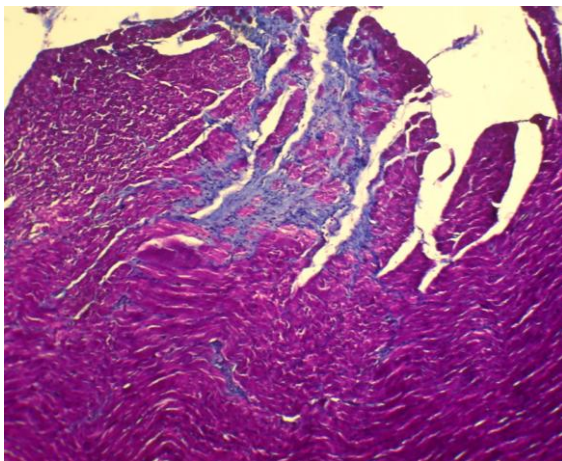
б



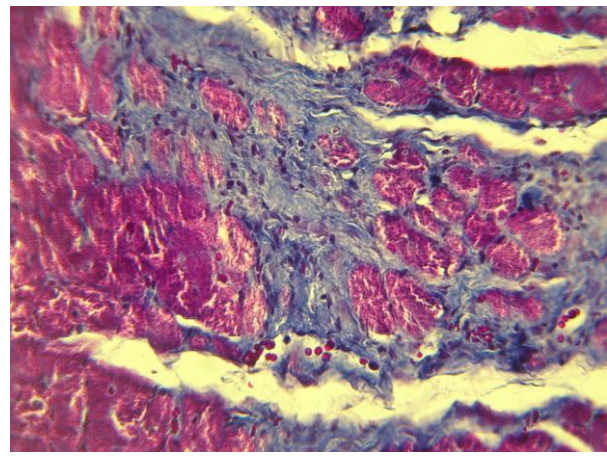
в



г



д



е

**Рис. 3.6. Морфология миокарда левого желудочка здоровой крысы (а, б) и структурные изменения при введении изопротеренола в течение 28 дней (в-е) Окрашка гематоксилином-эозином (в, г), по Массону (а,б, д, е). Ув. x100 (а, в, д). Ув.x400 (б, г, е).**

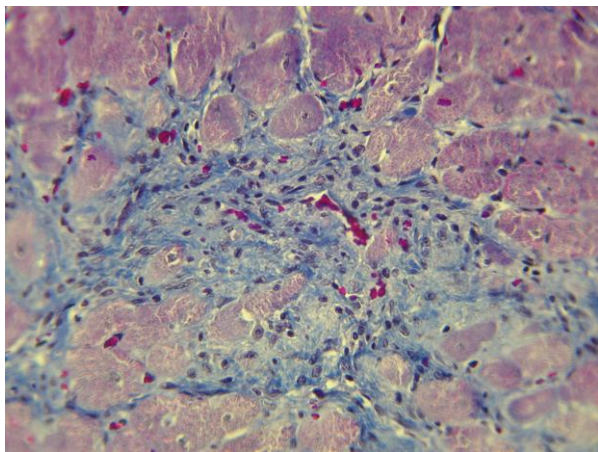
Ядра имели эллипсоидную форму, располагались в центре кардиомиоцитов, в них отмечалось умеренное содержание гетерохроматина. Наблюдался слабовыраженный периваскулярный и интерстициальный отек. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка и папиллярных мышцах обнаруживались участки фиброзной соединительной ткани. В отдельных случаях участки фиброзирования выявлены в периваскулярных отделах миокарда левого желудочка. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалось образование коллагеновых волокон, а также разрастание фиброзной ткани богатой коллагеновыми волокнами между кардиомиоцитами папиллярных мышц. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как умеренно выраженная. Морфологическая картина свидетельствует о репаративных процессах и начале фиброзирования миокарда (рис. 3.7).

При увеличении дозы вводимого соединения до 5 мг/кг/сут в миокарде отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация цитоплазмы. Наблюдался слабо выраженный периваскулярный и интерстициальный отек. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка и папиллярных мышцах обнаруживался слабовыраженный очаговый и сетчатый фиброз миокарда. В отдельных случаях небольшие участки фиброзирования сочетались с формированием грануляционной ткани, очаговой лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией миокарда левого желудочка. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалось слабо выраженное образование коллагеновых волокон. Площадь соединительной ткани (объемная плотность) оценена в среднем как слабо выраженная. Морфологическая картина свидетельствует о возникновении репаративных процессов и слабо выраженного фиброзирования миокарда в ответ на повреждение. Последнее носит характер обратимого и сочетается с незначительными признаками нарушений кровообращения в миокарде, а также с возникновением очагов продуктивного воспаления (рис. 3.7).

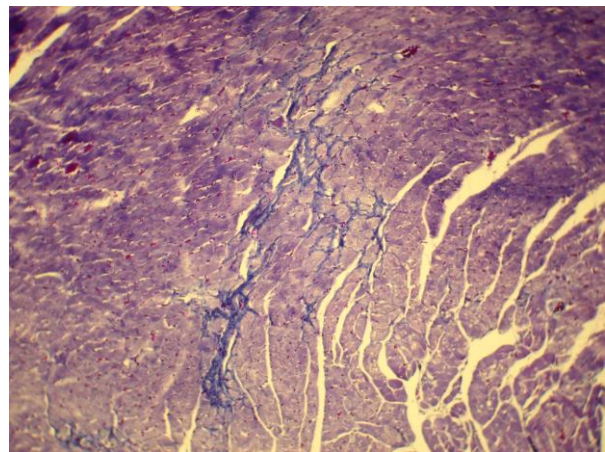
У животных с изопротереноловой ХСН, которым вводили милдронат (50 мг/кг/сутки) в течение 31 дня, отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация



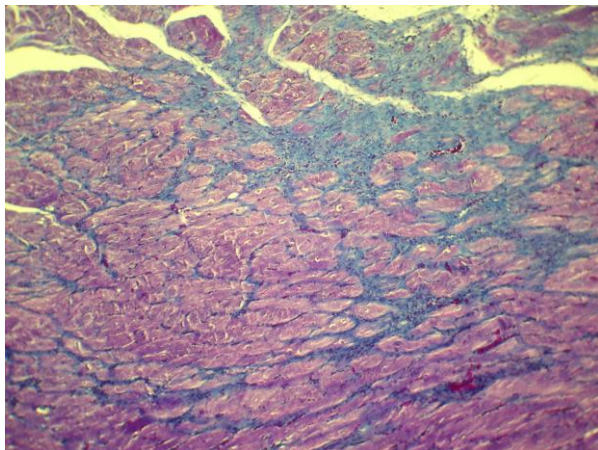
цитоплазмы. В большинстве случаев в субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка и папиллярных мышцах обнаруживались участки очагового и сетчатого фиброза, площадь которых оценена в большинстве случаев как умеренно выраженная. В отдельных случаях участки фиброзирования выявлены в периваскулярных отделах миокарда левого желудочка. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалась различная степень формирования коллагеновых волокон, которая в большинстве случаев оценена как умеренная. Морфологическая картина свидетельствует о преобладании сочетания очагового и сетчатого фиброзирования миокарда при небольшом количестве лимфоцитов и гистиоцитов в формирующейся соединительной ткани (рис. 3.7).



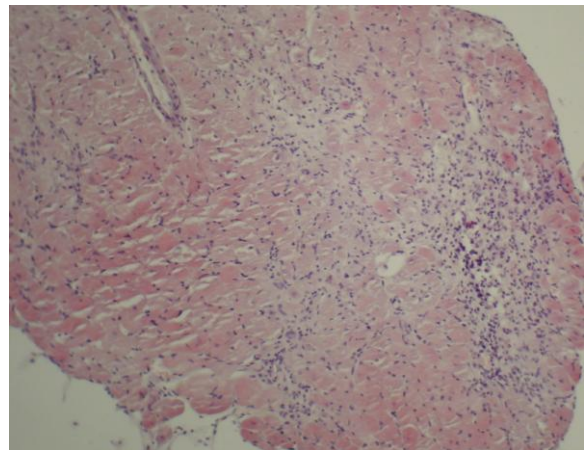
а



б



в



г

**Рис. 3.7. Морфология миокарда левого желудочка при длительном введении изопротеренола и его коррекции соединением РУ-1355 в дозах 1,25 мг/кг (а) и 5 мг/кг (б), милдронатом (в), предукталом (г). Окраска по Массону. Ув.х100 (б, в). Ув.х400 (а). Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100.(г).**

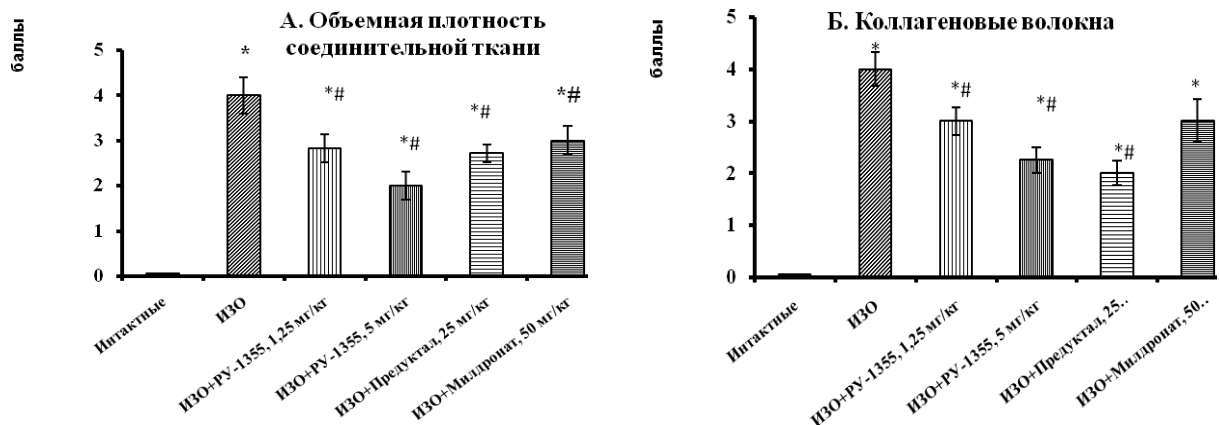
В миокарде крыс с ХСН, которым на фоне ИЗО вводили предуктал в дозе 25 мг/кг в течение 31 дня, наблюдались дистрофические изменения кардиомиоцитов; очаговое усиление ацидофилии цитоплазмы, набухание клеток, гомогенизация цитоплазмы. Ядра сохраняли эллипсоидную форму, располагались в центре кардиомиоцитов, в них отмечалось увеличение содержания гетерохроматина. Наблюдался слабовыраженный периваскулярный и интерстициальный отек. В субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка и папиллярных мышцах обнаруживались участки молодой соединительной ткани по типу грануляционной с различным количеством сосудов микроциркуляторного русла, богатой клеточными элементами, среди которых преобладали гистиоциты и лимфоциты. При окраске по Массону в очагах формирования соединительной ткани обнаруживалось небольшое количество коллагеновых волокон. Площадь грануляционной ткани (объемная плотность) оценена у большинства животных (57,1%) как умеренно выраженная. Морфологическая картина свидетельствует о репаративных процессах в миокарде (рис. 3.7).

Таким образом, при оценке результатов морфологических исследований показан статистически значимый рост как объемной плотности соединительной ткани, так и коллагеновых волокон в группах животных с ХСН (2-6) (рис. 3.6-3.8). Показано, что после 4-х недель введения ИЗО в дозе 5,0 мг/кг/сутки наблюдалась умеренная гипертрофия значительной части кардиомиоцитов, преимущественно в субэндокардиальных отделах миокарда у большинства животных с последующим формированием кардиосклероза.

Самый высокий уровень объемной плотности соединительной ткани (4 балла) и коллагеновых волокон (4 балла) наблюдался в контрольной группе (рис. 3.6; 3.8). Соединение РУ-1355, милдронат и предуктал ограничивали выраженность образования соединительной ткани (в том числе коллагена) статистически значимо по сравнению с группой ИЗО (рис. 3.7; 3.8).

Так у животных с ХСН, получавших РУ-1355 (1,25 мг/кг/сутки), объем соединительной ткани был статистически достоверно ниже, чем в контрольной группе по общей плотности на 29,3%, по уровню коллагена на 25%. При увеличении дозы изучаемого соединения до 5 мг/кг/сутки привело к снижению данных показателей на 50

и 43,8% соответственно ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.8. Влияние РУ-1355 и препаратов сравнения (предуктала и милдроната) на морфологические изменения в миокарде при хроническом повреждении изопротеренолом.** Примечание: различия статистически достоверны (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ) по отношению к группе: \* - «интактные»; # - «ИЗО».

Препараты сравнения предуктал и милдронат также статистически значимо по отношению к группе ИЗО ограничивали рост общей плотности соединительной ткани на 32,3 и 25% соответственно и формирование коллагеновых волокон на 50 ( $p < 0,05$ ) и 25%.

Таким образом, соединение РУ-1355 в дозе 5 мг/кг ограничивало степени фиброза и коллагенообразования левого желудочка подобно предукталу и превосходило милдронат.

### 3.3.4. Заключение

В исследованиях на животных с изопротереноловой ХСН были показаны кардиопротекторные свойства, в основе которых лежит регрессия процессов морфологического и гемодинамического ремоделирования желудочков.

При увеличении пред- и постнагрузки соединение РУ-1355 в диапазоне доз 1,25-5 мг/кг/сутки улучшает сократительную активность и функциональные резервы миокарда. Так, при нагрузке объемом соединение РУ-1355 (1,25 мг/кг/сутки) при курсовом введении увеличивает ЛЖД,  $dp/dt+$ , МИФС в 2,5, 3,2 и 4,7 раза соответственно активнее ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой с ИЗО. При увеличении дозы вводимого соединения наблюдается значимый рост  $dp/dt-$  и МИФС в 4,6 и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), по

сравнению с животными, получавшими меньшую дозу. При этом соединение РУ-1355 оказывает эффект подобный милдронату и превосходит предуктал.

В условиях максимальной изометрической нагрузки соединение РУ-1355 (в диапазоне доз 1,25-5,0 мг/кг/сутки) улучшает сократимость миокарда животных с ХСН, вызванной ИЗО, и сохраняет ее на достаточно высоком уровне. По сохранности эффекта (значению площади под фармакодинамическими кривыми прироста скоростей сократимости и расслабления ( $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ )) изучаемое вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки статистически значимо превосходит показатели контрольных животных с ИЗО в 2,7 и 2,1 раза. При сравнительной оценке эффектов выявлено, что соединение РУ-1355 сопоставимо с предукталом и превосходит милдронат по способности длительно удерживать нагрузку.

По итогам двух нагрузок (суммарной площади под кривой прироста эффекта) показано, что соединение РУ-1355 не только улучшает сократимость миокарда животных с ХСН, вызванной ИЗО, но и статистически значимо сохраняет ее на достаточно высоком уровне, то есть способствуют увеличению функциональных резервов сердца. В дозе 1,25 мг/кг/сутки практически не уступает препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходит их по влиянию на показатели сократимости.

Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг наиболее активно ограничивает рост тропонина I в плазме крови. По влиянию на уровень данного показателя вещество превосходит предуктал и милдронат в 2,2 и 2,5 раза, соответственно.

Соединение РУ-1355 подобно предукталу и милдронату влияет на количество промежуточного продукта ПОЛ - МДА. Уровень МДА в ткани миокарда животных с ХСН, получавших вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки, был в 1,7 раза ниже чем у контрольных, в дозе 5,0 мг/кг/сутки - в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ).

Соединение РУ-1355 уменьшает **морфологическое ремоделирование**. При оценке результатов микроморфологических исследований показано, что исследуемое соединение ограничивает образование соединительной ткани (в том числе коллагена), о чем свидетельствует более низкий уровень морфологических изменений в тканях миокарда по сравнению с группой ИЗО. Наиболее активно соединение РУ-1355



ограничивало фиброзирование левого желудочка в дозе 5 мг/кг. По выраженности эффекта вещество было сопоставимо с предукталом и превосходило милдронат.

Таким образом, учитывая тот факт, что соединение РУ-1355 не только улучшает сократимость миокарда животных с ХСН, но и способствует увеличению функциональных резервов сердца; ограничивает повреждение миокарда; нормализует процессы ПОЛ; задерживает рост соединительной ткани в миокарде, можно говорить о наличии у него кардиопротекторных свойств.

### **3.4. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355**

#### **3.4.1. Механизм антиаритмического действия соединения РУ-1355**

Процессы, происходящие в кардиомиоцитах как при ишемии, так и при реперфузии, приводят к изменению протонного градиента на мембране сарколеммы. Это стимулирует NHE, который осуществляет обмен: водород выходит из клетки, а натрий наоборот входит в клетку. Вследствие этого происходит увеличение концентрации натрия в кардиомиоцитах и, как результат этого, «перегрузка» клеток кальцием. Избыток ионов кальция вызывает активацию механизма re-entry, задержанных постдеполяризаций (триггерную активность), что приводит к развитию опасных для жизни тахиаритмий [Нарыжная, 2012]. Ингибиторы NHE способствуют регрессии ионного и электрофизиологического ремоделирования [Baartscheer, 2008].

В наших исследованиях было показано, что соединение РУ-1355 и селективный ингибитор NHE зонипорид в эффективных эквимоллярных дозах не оказывали влияния на основные параметры ЭКГ и были активны на экспериментальных моделях нарушений ритма ишемического генеза.

Можно предположить, что вещество не обладает прямым антиаритмическим действием. Его эффекты, в большей степени, опосредованы противоишемическими свойствами. В ранее проведенных нами исследованиях (глава 2.4.6.) было показано, что соединение РУ-1355 на модели 60-ти минутной ишемии и последующей 60-ти минутной реперфузии уменьшает зону некроза, при этом наблюдается более низкий подъем тропонина I по сравнению с группой ИЗО.

Современные антиаритмические препараты из группы блокаторов натриевых или кальциевых каналов показали низкую эффективность, а иногда и опасность применения у больных с инфарктом миокарда [Шогенов, 2011; Моисеев2, 2012б-г; Hashimoto, 2003]. Способность ограничивать кальциевую перегрузку дает возможность использовать ингибиторы NHE для предотвращения опасных нарушений ритма как до и в период ишемии, так и при реперфузии.

### **3.4.2. Механизм антиремоделлирующего<sup>1</sup> действия соединения PY-1355**

В основе гипертрофии миокарда, его ремоделировании и сердечной недостаточности лежат повышение нагрузки, синтез и высвобождение большого количества различных биологически активных веществ (факторов роста, таких как ангиотензин II, трансформирующий фактор роста  $\beta_1$ , инсулиноподобный фактор роста), служащих пусковыми факторами и вызывающих изменение внутриклеточной передачи сигнала через рецепторы [Katz, 2000].

Как уже было сказано, активация NHE является одним из пусковых механизмов внутриклеточных изменений при сердечной недостаточности. Внутриклеточный ацидоз играет ключевую роль в активации NHE. Кроме того, его активность регулируется гормонами, пара- и аутокринными регуляторами, а также механическими стимулами (на растяжение, клеточную деформацию) через один и тот же механизм, основанный на гидролизе фосфоинозитолфосфата, что приводит к активации киназ, стимулирующих активность NHE1 [Siszkowski, 1996; Wang, 1997; Moor, 1999], рибосомальной S6 киназы (RSK) [Moor, 2001; Cuello, 2007]. Реакции фосфорилирования могут быть вызваны факторами, провоцирующими гипертрофию и ремоделирование миокарда, такими как эндотелин [Khandoudi, 1994; Wu, 1993; Ito, 1997], ангиотензин-2 [Boston, 1998; Mattiazi, 1997], альфа-1-агонисты [Wallert, 1992; Puceat, 1995; Yokoyama, 1998], факторы роста [Wakabayashi, 1992].

Повышенное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов поддерживает сокращение, способствует продлению потенциала действия, в том числе за счет ингибирования перехода ионов калия во внеклеточное

---

<sup>1</sup> - под антиремоделлирующим действием в данном контексте понимаем способность ограничивать эффекты факторов роста.

пространство, а также за счет стимуляции в реверсном режиме  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  обмена. Дальнейшее прогрессирование гипертрофии сердца способствует развитию сердечной недостаточности, обусловленной отклонениями в  $\text{Ca}^{2+}$  обмене, некротическим повреждением миокарда и увеличением интерстициального фиброза [Osadchii, 2007a,б].

По литературным данным в основе действия ингибиторов NHE при ХСН лежит влияние на обмен кальция в клетке и снижение активности прогипертрофических факторов [Yamazaki, 1998; Cingolani, 1998]. Также под действием неселективного блокатора NHE амилорида уменьшается норэпинефрин-индуцированный синтез белка в культурах крысиных кардиомиоцитов [Hori, 1990]. Аналогичный результат был получен для специфичного блокатора NHE1 HOE 694 [Schluter, 1998].

Соединение РУ-1355 ингибирует NHE-1 (глава 2.4.), что, в конечном итоге, нормализует внутриклеточный обмен кальция. О чем свидетельствует, в первую очередь, улучшение сократимости миокарда животных с ХСН и увеличение функциональных резервов сердца.

Вещество ограничивает влияние прогипертрофических факторов, тем самым способствует уменьшению степени обратимых и необратимых повреждений кардиомиоцитов и, как следствие, снижению объема формирующейся грануляционной ткани в миокарде, а в последующем меньшей выраженности кардиосклероза (фиброза) и сердечной недостаточности. О снижении повреждающего действия свидетельствует не только результаты морфологических исследований, но и влияние на уровень Тн I и МДА.

### 3.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было найдено соединение РУ-1355, обладающее противоишемическими, противоаритмическими, антифибрилляторными и антиремоделлирующими свойствами, что и определяет его кардиопротекторный эффект.

В исследованиях *in vitro* было показано, что соединения РУ-1355 активно ингибирует NHE тромбоцитов кролика ( $\text{IC}_{50}=5,42 \times 10^{-10}$  М), и по терапевтическому индексу превосходит препарат сравнения зонипорид (см. главу 2).

Соединение РУ-1355 в дозе 1,12 мг/кг (внутривенно за 10 минут до ишемии)

оказывает **противоишемическое** действие на модели длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс. Вещество уменьшает тяжесть ишемического повреждения миокарда: к 60-й минуте реперфузии наблюдалось статистически значимое снижение подъема сегмента ST, которое составило 32% по отношению к контролю без лечения и 43,3% по отношению к ишемии на 50-ой минуте в своей группе. У животных, получавших соединение РУ-1355, наблюдалось достоверное уменьшение зоны инфаркта по сравнению с контрольной группой с ишемией в 1,8 раза, по сравнению с зонипоридом в 1,3 раза. Изучаемое вещество ограничивало рост тропонина I в плазме крови, уровень которого оказался ниже такового у контрольных животных в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), и на 19% зонипорида (см. главу 2).

Соединение РУ-1355 способствует регрессии ионного и электрофизиологического ремоделирования, тем самым проявляет **антиаритмические и антифибрилляторные** свойства. Данный эффект наблюдается при введении как профилактически, так и в период ишемии. Вещество статистически достоверно в 2 раза снижает выраженность постреперфузионных нарушений ритма при длительной ишемии и предотвращает развитие фибрилляции желудочков при кратковременной ишемии ( $ED_{50}$  равна 1,25 мг/кг); увеличивает порог электрических фибрилляций желудочков на 110,4%, и сокращает время до восстановления ритма на 42,8%. Соединение РУ-1355 в эффективной дозе 1,25 мг/кг не влияет на параметры ЭКГ при однократном введении.

В исследованиях на животных с изопротереноловой ХСН было показано, что соединение РУ-1355 вызывает регрессию процессов морфологического и кардиодинамического ремоделирования желудочков.

При суммарной оценке результатов увеличения пред- и постнагрузки показано, что соединение РУ-1355 не только улучшает сократимость миокарда животных с ХСН, вызванной ИЗО, но и статистически значимо сохраняет ее на достаточно высоком уровне, то есть способствуют увеличению функциональных резервов сердца. В дозе 1,25 мг/кг/сутки практически не уступает препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходит их по основным показателям.

Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг статистически значимо ограничивает степень тяжести повреждения, о чем свидетельствует более медленный рост тропонина I

в плазме крови по сравнению с предукталом и милдронатом в 2,2 и 2,5 раза соответственно. Изучаемое вещество подобно предукталу и милдронату ограничивает рост МДА в ткани миокарда животных с ХСН, получавших вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки, в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой, в дозе 5,0 мг/кг/сутки - в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ).

Соединение РУ-1355 уменьшает морфологическое ремоделирование. При оценке результатов морфологических исследований показано, что исследуемое соединение ограничивает образование соединительной ткани, в том числе коллагена, подобно предукталу и превосходило милдронат. Наиболее активно соединение РУ-1355 ограничивало фиброзирование левого желудочка в дозе 5 мг/кг.

Таким образом, в эксперименте были подтверждены кардиопротекторные свойства изучаемого соединения нового ингибитора NHE. Предполагаемый механизм действия может быть связан с ограничением избыточного поступления кальция внутрь кардиомиоцитов при ишемическом и неишемическом повреждении миокарда, нормализации его обмена, а также с ограничением активации профибротических факторов.

## ГЛАВА 4. АНТИФИБРИЛЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Несмотря на прогресс, достигнутый в области катетерной абляции триггерных зон и проводящих путей аритмий и имплантации кардиовертеров-дефибрилляторов [Моисеев2, 2010а,б, 2012б-г; Macintyre, 2014; Baher, 2013], признается тот факт, что в настоящее время применение этих эффективных инвазивных методов при лечении нарушений ритма сердца у большинства пациентов невозможно, даже без учета их высокой стоимости и определенного хирургического риска [Zimetbaum, 2012; Kumar, 2013]. Эффективность же лекарственной терапии, оцениваемая по восстановлению стабильного синусового ритма, не превышает 50-70% [Карпов, 2009].

В 90-х годах 20 века проведен ряд мультицентровых исследований эффективности антиаритмических препаратов (CAST, CASCADE и ESVEM и др.). Было показано, что антиаритмики 1 класса повышали смертность больных, перенесших инфаркт миокарда. При этом смертность возросла в целом на 11%, а при лечении селективными препаратами 1С подкласса - на 42% по сравнению с контрольной группой [Мазур, 1994; Мареев, 1996; Skanes, 1996; Hohnloser, 1997; Das, 2010]. Те же самые исследования показали не только высокую антиаритмическую активность препаратов III класса (кордарона и соталола) при суправентрикулярных и вентрикулярных нарушениях ритма, но и положительное влияние на летальность при длительной терапии больных, страдающих злокачественными тахиаритмиями [Singh1, 1995; Meinerzt, 1997]. Однако, в исследованиях SWORD и SCD-HeFT было показано, что и антиаритмические препараты III класса (d-соталол и кордарон), несмотря на подавление желудочковой эктопической активности, ухудшали прогноз больных, перенесших острый инфаркт миокарда или имеющих выраженную хроническую сердечную недостаточность III-IV функционального класса [Беленков, 2008; Bardy, 2005; Vrana, 2013].

Попытки создания антиаритмических препаратов III класса новой генерации - так называемых «чистых» (высокоселективных) блокаторов выходящих калиевых токов (таких как, d-соталол, сематилид, дофетилид, алмокалант, ибутилид и др.) не дали позитивных результатов [Singh1, 1996a,b; Barnes, 2010]. Хотя, в многочисленных

исследованиях показана высокая купирующая и профилактическая активность: эффективность дофетилида при мерцательной аритмии составляет 39-58%, нибентана при суправентрикулярных нарушениях ритма - 35-92% [Радзевич, 2007; Майков, 2010]. Однако, возросла частота развития проаритмических эффектов, в частности пароксизмов полиморфной желудочковой тахикардии [Дощицин, 2008; Кузьмин, 2010; Barnes, 2010; Kobayashi, 2013]. Так она является минимальной у амиодарона, составляя примерно 0,34-1%, у соталола и d-соталола увеличивается до 4 - 5% и более высокая у новых препаратов III класса: нибентана - 5,8%, ибутилида - 24,86% [Метелица, 2005], алмокаланта - 10%, дофетилида - 11%, сематилид - 21% [Lazzara, 1993]. То, что кордарон реже, чем другие антиаритмические препараты III класса, оказывает проаритмическое действие, несмотря на значительное увеличение продолжительности интервала QT, многие авторы объясняют неселективностью действия [Singh1, 1988; Кузьмин, 2010].

Таким образом, было выявлено, что при одинаковой эффективности антиаритмических препаратов, опасность развития побочных эффектов, и, особенно, аритмогенеза у селективных препаратов на много выше чем у неселективных [Barekatin, 2012]. Идея создания высокоселективного препарата, влияющего только на один трансмембранный ионный ток, оказывается неперспективна для создания высокоэффективного и безопасного антиаритмика [Burashnikov, 2009, 2011; Heijman, 2013]. Кроме того, были определены новые мишени и выдвинуты идеи новых подходов к созданию антиаритмических препаратов [Singh1, 2007; Singh2, 2009; Savelieva, 2008; Gramley, 2009; Carlsson, 2010; Dobrev, 2010, 2012], разработана концепция *upstream* терапии [Гуревич, 2009; Моисеев, 2011; Шаваров, 2011; Шогенов, 2011; Мазур, 2012; Nanda, 2010; Ravens, 2010; Reinhart, 2011; Heijman, 2013].

В международных рекомендациях по лечению аритмий Американской ассоциации сердца и Европейской ассоциации кардиологов наиболее эффективным антиаритмиком для профилактики внезапной сердечной смерти при лечении фибрилляции предсердий и желудочковых аритмий признан кордарон [Канорский, 2007; ACC/AHA/ESC 2006; Ong, 2011, Santangeli, 2012]. В качестве препарата выбора его используют 24,1% пациентов в США, 34,5% - в Европе [Шубик, 2008]. Для фармакологической кардиоверсии фибрилляций предсердий, кроме кордарона, используются препараты с доказанной

эффективностью, такие как пропafenон и этализин, а также недостаточно изученные дизопирамид, новокаинамид, соталол [Гуревич, 2009; Шогенов, 2011; Bontempo, 2011; Patel, 2011; Kappenberger, 2013; Thihalolipavan, 2014]. Для терапии наджелудочковых тахикардий бета-блокаторы, верапамил, дилтиазем, кордарон, соталол, пропafenон, новокаинамид [Бунин, 2006, 2009, 2010; Benito, 2012; Hohnloser, 2012; Haywood 2013; Nijjer, 2014]. В соответствии с Рекомендациями Минздравсоцразвития России [2007] для врачей, оказывающих первичную медико-санитарную помощь, в условиях сердечно-легочной реанимации для купирования фибрилляций желудочков может использоваться лидокаин.

Являясь классическим эталоном антиаритмиков III класса, кордарон не принадлежит к чистым блокаторам калиевых каналов. Он обладает множественным механизмом действия: влияет на различные трансмембранные ионные токи –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ; обладает адrenoблокирующим действием, является структурным аналогом тиреоидных гормонов. При эффективности кордарона в 60-90% случаев [Голицин, 2003, 2011; Канорский, 2007; Гиляров, 2006; Моисеев2, 2010а,б], побочные эффекты, потребовавшие отмены кордарона составили: аритмогенный – 0-7%, другие кардиогенные и некардиогенные – 11,5-27% [Фисенко, 2003; Моисеев2, 2009, 2012аб; Santangeli, 2012; Burra, 2013]. Особенности фармакокинетических свойств (медленное насыщение, способность к кумуляции, длительная элиминация, отсутствие корреляции: сывороточная концентрация/вероятность побочных эффектов) кордарона так же ограничивает его применение. Кроме того, кордарон изменяет фармакокинетику препаратов, метаболизирующихся с помощью цитохрома P-450. Можно констатировать, что хотя кордарон остается эффективным антиаритмиком при лечении предсердных и желудочковых аритмий, особенности фармакокинетики и фармакодинамики, а также большое количество побочных эффектов серьезно ограничивают применение этого препарата.

Основная цель лечения нарушений ритма связана не только с подавлением эктопической активности, но и с улучшением прогноза для жизни. Именно снижение частоты внезапной сердечной смерти в настоящее время считают основным критерием эффективности антиаритмической терапии [Моисеев2, 2012б-г; Singh1, 2007; Singh2, 2009;



Nanda, 2010]. Поэтому актуальным остается поиск у современных антиаритмических препаратов кардиопротекторных свойств - антифибрилляторных и противоишемических, способствующих регрессии ионного и электрофизиологического ремоделирования миокарда.

Ранее в исследованиях *in silico* и *in vitro* (глава 2.3.) было найдено соединение - 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол - амфедазол. Оно увеличивает рефрактерность изолированных предсердий, превосходит амиодарон как по абсолютной величине эффекта, так и терапевтическому индексу (табл. 2.6). Кроме того, оказывает дозозависимое блокирующее влияние на калиевые трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция (табл. 2.7). То есть соответствует современным представлениям об активном антиаритмическом препарате. Для подтверждения кардиопротекторных свойств необходимо было изучить его антифибрилляторные и противоишемические свойства.

#### 4.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Влияние на трансмембранные ионные токи было изучено в лаборатории биовозбудимых мембран НИИ по БИХС (Россия, Купавна) и под руководством д.б.н. В.И. Поротикова на изолированных трабекулах предсердий лягушки [Поротиков, 2008]. Более подробно методика описана в главе 2.1 и приложении 38. Амфедазол изучали в диапазоне концентраций  $1 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-5}$  М. В качестве препаратов сравнения были использованы антиаритмические препараты и соединения с известными ионными механизмами действия - этмозин ( $5 \cdot 10^{-6}$  М), хинидин ( $7 \cdot 10^{-5}$  М), новокаиномид ( $1,8 \cdot 10^{-4}$  М), антагонист кальция Д-600 ( $2 \cdot 10^{-6}$  М), лидокаин ( $1,0 \cdot 10^{-4}$  М).

Все исследования *in vivo* проводились в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств [Галенко-Ярошевский, 2012].

Исследования проводили на 106 белых неинбредных крысах-самцах массой 200-400 г и 80 кошках обоего пола 2,5-3,5 кг. Условия содержания и проведения исследований

более подробно описаны в главе 2.1. Все эксперименты были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 02 февраля 2011).

Влияние соединений на **электрические фибрилляции предсердий** [Самвелян, 1981] изучали на кошках ( $n=20$ ), наркотизированных этаминалом натрия (50 мг/кг, внутривенно) массой 2,0 - 4,5 кг, в условиях искусственной вентиляции легких, торакотомии и перикардотомии. "Эктопический очаг" возбуждения создавали электрической стимуляцией импульсным током (напряжение 20 В, частота 20 Гц) с помощью подшитых к правому предсердию игольчатых электродов (электростимулятор ЭС-50-01, Россия). Регистрировали: электрокардиограмму во 2-м стандартном отведении с помощью медицинского осциллографа ОС-01 (Россия) на самописце Н-338-8 (Россия), предсердную электрограмму на кардиоэнцефалографе КЭС-02 (Россия), артериальное давление с помощью электроманометра на самописце Н-338-8 (Россия). Нарушения ритма контролировали по зубцу Р электрокардиограммы, изменению предсердной электрограммы, снижению артериального давления.

Амфедазол вводили внутривенно со скоростью 0,5 мг/кг в минуту до восстановления синусового ритма, предсердной электрограммы и нормализации артериального давления. Препарат сравнения использовали в эквивалентном объеме. Начало введения изучаемых препаратов при моделировании электрических фибрилляций предсердий осуществлялось через 30 минут после возникновения аритмии. За минимальную эффективную (МЭД) принимали дозу, в которой восстановление синусового ритма (антиаритмический эффект) продолжалось не менее 2-х минут.

Изучение влияния соединений на **желудочковые фибрилляции, вызванные аконитином** [Генденштейн, 1961], проводили на наркотизированных (нембутал, 40 мг/кг, внутривенно) крысах-самцах ( $n=60$ ) массой 160-240 г (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН, ветеринарное свидетельство 247 № 0080153 от 28.11.2012). Нитрат аконитина вводили внутривенно в дозе 50 мкг/кг. Нарушения ритма сердца определяли по электрокардиограммам (2-е стандартное отведение) при непрерывном визуальном наблюдении на экране электрокардиографа в течение 60 мин. Амфедазол вводили за 5 минут до аконитина внутривенно в возрастающих дозах начиная с 0,1 мг/кг. Рассчитывали  $ED_{50}$  – эффективную дозу, в 50% случаев предотвращающую возникновение нарушений

ритма сердца.

В качестве **препарата сравнения** в исследованиях, описанных выше, использовали амиодарон 5% раствор для инъекций (KRKA, Словения) по аналогичной схеме введения.

Антифибрилляторный эффект **при кратковременной ишемии миокарда** изучали у крыс-самцов (n=46) весом 380-450 грамм (ООО «Питомник РАМН», ветеринарное свидетельство 250 № 0453089 от 16.03.2013). Более подробно метод описан в главе 2.1.. Вещества вводили за 5 минут до ишемии в дозах 0,1; 0,3; 0,6; 0,9 мг/кг для амфедазола и 1; 2,5; 5; 10 мг/кг для амиодарона (дозы эквивалентны  $ED_{50}$  на модели аконитиновой желудочковой фибрилляции).

Влияние соединений на **максимально воспроизводимую частоту и порог фибрилляций желудочков**, вызванных электрической стимуляцией [Бердяев, 1986, 1990; Breithardt, 1994], изучали на кошках (n=20), наркотизированных этаминалом натрия (50 мг/кг, внутривенно) массой 2,0 - 4,5 кг, в условиях искусственной вентиляции легких. Эктопический очаг возбуждения создавали электрической стимуляцией с помощью подшитых к левому желудочку игольчатых электродов (электростимулятор ЭС-50-01, Россия) в условиях торакотомии и перикардотомии.

Порог фибрилляций определяли повторным сканированием уязвимого периода из 90 прямоугольных импульсов постоянного тока длительностью 4 мс и увеличивающейся интенсивности (частота 50 Гц) до тех пор, пока не возникала фибрилляция желудочков. Дефибрилляцию производили с помощью разряда заданной активности, создаваемого непосредственно на миокард от дефибриллятора ДИ-03 (Россия). Величину порога оценивали как минимальную интенсивность тока в миллиамперах, при которой возникала фибрилляция предсердий или желудочков.

В этой же серии экспериментов определялся порог навязанного ритма. На миокард через игольчатые электроды подавались прямоугольные импульсы постоянного тока длительностью 4 мс пороговой силы тока (порог навязанного ритма) и увеличивающейся частотой. За пороговую величину принимали ту частоту, при которой происходил срыв навязанного ритма и желудочки начинали сокращаться в своем ритме. Усвоение сердцем навязанного ритма определяли по ЭКГ, записываемой во втором стандартном отведении, изменению артериального давления.

Амфедазол вводили в дозах 1,0; 1,7; 3,0 мг/кг. Препаратом сравнения был выбран лидокаин (2% раствор для инъекций (“Мосхимфармпрепараты”, Россия)) в дозе 5 мг/кг как один из рекомендованных для купирования фибрилляций желудочков [Формулярная система, 2014]. Все параметры определялись до и через 15, 30, 60, 90 минут после внутривенного (в яремную вену) введения вещества.

**Влияние соединений на толерантность миокарда к ишемии и на течение ишемического повреждения миокарда** изучали на кошках (n=20) массой 2,5–4,0 кг, наркотизированных нембуталом (50 мг/кг, внутривенно), в условиях искусственной вентиляции легких, торакотомии и перикардотомии. Дозированная ишемия миокарда проводилась по методу, описанному [Каверина, 1980], и достигалась уровнем перевязки (левой коронарной артерии в верхней ее трети) и эластичной лигатурой. Эпикардальную электрокардиограмму записывали с помощью электродов в виде крючков с шести точек поверхности сердца: четыре электрода находились в зоне ишемии, два - в параишемической зоне. Регистрация велась на электрокардиографе ЭК-6Т-02 (Россия) с тепловой записью. О степени ишемического повреждения миокарда судили по суммарному подъему сегмента ST эпикардальной электрограммы.

В качестве препарата сравнения был выбран антиаритмический препарат III класса с противоишемическими свойствами - амиодарон. Исследуемые препараты вводили внутривенно через 15 минут после окклюзии коронарной артерии со скоростью для амфедазола - 0,15 и 0,3 мг/кг/мин, для амиодарона - 5 мг/кг/мин в течение 15 минут.

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Выполняли расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $M$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ). Проверку выборки на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение трех и более независимых выборок проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна. Сравнение трех и более зависимых выборок проводили непараметрическим методом Фридмана с посттестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ . Для исследуемого соединения и препарата сравнения были экспериментально определены

величины  $ED_{50}$  с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excel (пакет Office XP, Microsoft, США).

## 4.2. ЭФФЕКТ АМФЕДАЗОЛА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ

Характерной особенностью амфедазола является его одновременное влияние на калиевые, натриевые и кальциевые токи (табл. 4.1).

При этом для выходящего калиевого тока наблюдается прямая зависимость концентрация-эффект. При введении амфедазола в дозе  $1 \cdot 10^{-6}$  М калиевый ток уменьшился на 39%, в дозе  $5 \cdot 10^{-5}$  М был заблокирован на 60%. Уменьшение калиевого тока в присутствии изучаемого вещества оказалось подобно эффекту хинидина, а эффективные концентрации - одного порядка (для хинидина  $3 \cdot 10^{-6}$  М). Амiodарон оказывает аналогичное влияние на калиевые токи в близких веществу концентрациях [Baxton, 1982]. На рис. 4.1 представлены вольт-амперные характеристики выходящего калиевого тока.

Таблица 4.1

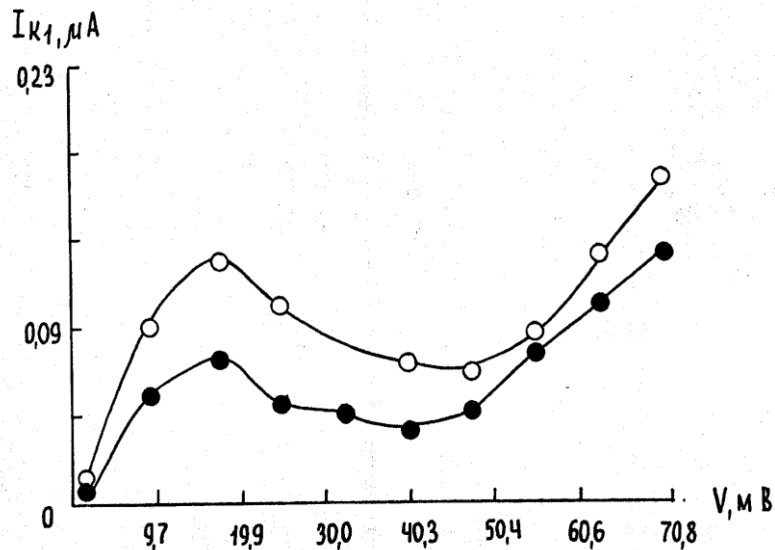
**Влияние амфедазола и известных антиаритмических препаратов на трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки**

№	Соединение	МЭК, М ***	Концентрация соединения, (М)	Ионные токи (в %)		
				$I_{K^+}$	$I_{Na^+}$	$I_{Ca^{2+}}$
1	Амфедазол	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	-39	+15	-30
			$5 \cdot 10^{-6}$	-45	-30	-33
			$1 \cdot 10^{-5}$	-51	-30	-35
			$5 \cdot 10^{-5}$	-60	-34	-34
2	Морицизин (этмозин)*	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	0	-40-70	0
3	Хинидин**	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$	-55	-35	0
4	Новокаинамид**	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	+5,0	-59	0
5	Антагонист кальция Д-600**	-	$2 \cdot 10^{-6}$	0	0	-100
6	Лидокаин**	-	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0	-30	0

\* - данные по влиянию на трансмембранные ионные токи получены Розенштраухом, 1981;

\*\* - данные по влиянию на трансмембранные ионные токи получены Поротиковым, 1979;

\*\*\* - результаты собственных исследований по определению МЭК на изолированных предсердиях.



**Рис. 4.1.** Вольт-амперные характеристики выходящего калиевого тока, измеренного через 150 мс после включения прямоугольного стимула варьированной амплитуды. Примечание: ○ - контроль, ● - амфедазол,  $1 \cdot 10^{-5}$  М, 12 мин.

В отношении быстрого  $\text{Na}^+$  и медленного  $\text{Ca}^{2+}$  ионных токов дозозависимого блокирующего эффекта не наблюдалось. Соединение угнетает входящий кальциевый ток уже в низких концентрациях ( $1 \cdot 10^{-6}$  М), по выраженности эффекта уступает блокатору кальциевых каналов Д-600. В дозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М соединение блокирует токи натрия на 30%, подобно лидокаину в дозе  $1 \cdot 10^{-4}$  М, уступая этмозину и новокаиnamиду.

Таким образом, при сравнительном изучении влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи показан сложный кордароноподобный мембранотропный эффект, отличный от других известных антиаритмических препаратов: выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция.

### 4.3. ПРОТИВОФИБРИЛЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АМФЕДАЗОЛА

#### 4.3.1. Эффективность амфедазола при предсердных и желудочковых фибрилляциях неишемического генеза

Амфедазол обладает выраженной антиаритмической активностью и превосходит препарат сравнения на модели **фибрилляции предсердий, вызванных**

### электростимуляцией.

Предсердные нарушения ритма проявлялись исчезновением зубца Р на электрокардиограмме и появлением вместо него многочисленных волн, на предсердной электрограмме исчезали нормальные сокращения и появлялись беспорядочные сокращения отдельных участков предсердий. Кроме того, происходило снижение артериального давления в среднем на 20-40 мм рт. ст. Продолжительность нарушений ритма составила в среднем 58 минут.

При изучении влияния амфедазола на фибрилляции предсердий, вызванных электростимуляцией, был получен выраженный антиаритмический эффект. Соединение при постоянной внутривенной инфузии в суммарной дозе 0,91 мг/кг в 100% случаев восстанавливало синусовый ритм, нормализовало предсердную электрограмму. Повышение давления происходило до исходного уровня. Результаты сравнительного анализа противоаритмической активности на данной модели аритмий представлены в табл. 4.2.

Амфедазол превосходил амиодарон как по показателям минимальной эффективной дозы (в 8,5 раза), так и величине терапевтического индекса.

Таблица 4.2

#### Антиаритмическая активность амфедазола и амиодарона при фибрилляциях, вызванных электрической стимуляцией предсердий у кошек ( $M \pm m$ )

№	Вещество	n	МЭД, мг/кг	ЛД <sub>50</sub> , (мг/кг, в/в)	Терапевтический индекс, ЛД <sub>50</sub> /МЭД
1	Амфедазол	8	0,91±0,16	17,0	18,68
2	Амиодарон	5	7,7±0,66	135,5*	17,59

\* - по данным Beckers (1987)

Амфедазол обладает выраженной антиаритмической активностью на моделях желудочковых фибрилляций. На экспериментальной модели нарушений ритма, вызванных внутривенным введением аконитина, в контрольных опытах аконитин в дозе 50 мкг/кг в 100% случаев вызывал фибрилляции желудочков и гибель животных. Нарушения ритма возникали в первые две минуты, гибель животных наступала через 20-60 минут. ЕД<sub>50</sub> амфедазола в данной серии опытов составила 0,3 мг/кг (табл. 4.3).

Вещество оказалось активнее амиодарона как по величине  $ED_{50}$  в 33,3 раза, так и по терапевтическому индексу в 4,2 раза.

Таблица 4.3

**Антиаритмическая активность амфедазола и амиодарона при желудочковых фибрилляциях, вызванных внутривенным введением аконитина у крыс**

№	Вещество	n	$ED_{50}$ (мг/кг, в/в)	$LD_{50}$ , (мг/кг, в/в)	Терапевтический индекс, $LD_{50} / ED_{50}$
1	Амфедазол	8	0,3	17,0	56,7
2	Амиодарон	5	10,0	135,5*	13,5

\* - по данным Beckers (1987)

**4.3.2. Активность амфедазола при постреперфузионных фибрилляциях**

У всех животных после перевязки ствола левой коронарной артерии на ЭКГ во II стандартном отведении были выявлены проявления ишемии и повреждения миокарда.

В контрольной группе после реперфузии у 80% животных наблюдали сначала спонтанные одиночные экстрасистолы, затем множественные. На второй минуте наблюдений развивалась тахикардия, переходящая затем в фибрилляцию. У 10% животных возникла пароксизмальная тахикардия без перехода в фибрилляцию, у 10% - выраженная брадикардия.

При профилактическом введении изучаемых соединений за 5 минут до реперфузии в различных дозах наблюдался лечебный эффект.  $ED_{50}$  амфедазола в данной серии опытов оказалась равной 0,2 мг/кг (табл. 4.4). Таким образом, вещество оказалось активнее амиодарона как по величине  $ED_{50}$  в 9 раз, так и по терапевтическому индексу на 13%.

Таблица 4.4

**Антиаритмическая активность амфедазола и амиодарона при постреперфузионных желудочковых нарушения ритма сердца у крыс**

№	Вещество	n	$ED_{50}$ (мг/кг, в/в)	$LD_{50}$ , (мг/кг, в/в)	Терапевтический индекс, $LD_{50} / ED_{50}$
1	Амфедазол	18	0,2	17,0	85,0
2	Амиодарон	18	1,8	135,5*	75,3

\* - по данным Beckers (1987)



### 4.3.3. Влияние амфедазола на частоту навязанного ритма и порог электрических фибрилляций сердца лабораторных животных

При стимуляции раздражения в эктопическом очаге, превышающего исходную частоту возбуждения синусового узла, на электрокардиограмме последовательно возникают единичные, затем групповые экстрасистолы и фибрилляции желудочков.

При изучении влияния амфедазола на **максимально воспроизводимую частоту и порог фибрилляций желудочков**, вызванных электрической стимуляцией, были получены следующие результаты (табл. 4.5). Для возникновения фибрилляций желудочков после введения исследуемого соединения требовалась значительно большая интенсивность электрического раздражения, чем до введения.

Таблица 4.5

**Влияние амфедазола и лидокаина на порог электрических фибрилляций желудочков (mA) и максимально воспроизводимую частоту сердечных сокращений ( $\Delta$  %) наркотизированных кошек ( $M \pm m$ )**

№	Время (минуты)	Влияние на:							
		порог электрических фибрилляций желудочков (mA)				максимально воспроизводимую ЧСС (дельта % по отношению к исход)			
		Амфедазол в дозе (мг/кг):			Лидокаин (мг/кг)	Амфедазол в дозе (мг/кг):			Лидокаин (мг/кг)
		1	1,7	3	5	1	1,7	3	5
		n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
1	исход	2,10 $\pm$ 0,14	4,80 $\pm$ 2,50	1,90 $\pm$ 0,16	1,90 $\pm$ 0,21	0	0	0	0
2	1	13,05 $\pm$ 0,94*	26,47 $\pm$ 1,85*#	39,33 $\pm$ 4,95*#	13,11 $\pm$ 1,72*	-23,34 $\pm$ 3,36*	-28,37 $\pm$ 2,28*	-40,00 $\pm$ 9,82*	-36,00 $\pm$ 7,45*
3	15	5,46 $\pm$ 0,42*	22,68 $\pm$ 2,37*#	12,54 $\pm$ 2,47*#	4,94 $\pm$ 0,96*	-21,32 $\pm$ 9,43*	-21,94 $\pm$ 2,23*	-23,00 $\pm$ 9,84*	-20,82 $\pm$ 6,21*
4	30	2,31 $\pm$ 0,41	8,42 $\pm$ 1,12*#	7,98 $\pm$ 1,5*#	2,28 $\pm$ 0,10	-12,00 $\pm$ 2,00*	-13,25 $\pm$ 3,26*	-13,96 $\pm$ 5,12*	-8,00 $\pm$ 4,62
5	60	2,10 $\pm$ 0,23	7,24 $\pm$ 0,87#	2,85 $\pm$ 0,23*	2,34 $\pm$ 0,28	-5,33 $\pm$ 5,33	-2,23 $\pm$ 1,33	-1,33 $\pm$ 1,33	0
6	90	2,10 $\pm$ 0,23	6,00 $\pm$ 1,25#	2,47 $\pm$ 0,21	1,9 $\pm$ 0,28	0	0	0	0

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: \* - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ); # - «лидокаину» (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

Амфедазол в диапазоне доз (1,0 (1/17 ЛД<sub>50</sub>); 1,7 (1/10 ЛД<sub>50</sub>) и 3,0 (1/6 ЛД<sub>50</sub>) мг/кг) статистически достоверно повышал порог электрических фибрилляций желудочков в 6,2; 5,5 и 20,7 раз соответственно. Повышение порога фибрилляций отмечалось в течение 15-60 минут (в зависимости от вводимой дозы). Препарат сравнения - лидокаин – в дозе 5 мг/кг (1/5 ЛД<sub>50</sub>) увеличивал порог электрических фибрилляций желудочков в 6,9 раза в течение 15 минут.

Согласно литературным данным ЛД<sub>50</sub> лидокаина у крыс при внутривенном введении составляет 25 мг/кг [Lewis, 1996]. При сравнительном анализе эффективности установлено, что амфедазол в дозе 1 мг/кг (1/17 ЛД<sub>50</sub>) оказывает на порог электрических фибрилляций эффект, подобный лидокаину в дозе 5 мг/кг (1/5 ЛД<sub>50</sub>). В дозах, эквивалентных 1/5-1/6 ЛД<sub>50</sub>, исследуемое соединение превосходило препарат сравнения как по абсолютной величине повышения порога электрических фибрилляций в 3 раза, так и по длительности антифибрилляторного эффекта в 3-4 раза.

Амфедазол во всех дозах статистически достоверно снижал максимально воспроизводимую частоту сердцебиений (табл. 4.5), то есть подавлял эктопический водитель ритма в течение 30 минут. Наибольшее влияние соединения отмечалось на первой минуте в дозе 3 мг/кг, когда произошло снижение максимально воспроизводимой частоты сокращений на 40%. Эффект лидокаина продлился 15 минут, максимально снижение изучаемого показателя отмечено на первой минуте и составило 36%. Несмотря на примерно одинаковую силу действия лидокаина и амфедазола, эффект второго был более длительным (в 2 раза).

#### **4.4. ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АМФЕДАЗОЛА**

В экспериментах по изучению влияния на течение ишемического повреждения миокарда при дозируемой окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии исследуемые вещества проявили противоишемический эффект (приложение 25.). Амфедазол, введенный на фоне ишемии миокарда, вызывал статистически достоверное по отношению к исходному уровню ишемии (через 15 минут после коронароокклюзии) снижение суммарного сегмента ST в обеих дозах. При этом наблюдался дозозависимый эффект.

При постоянной внутривенной инфузии со скоростью 0,15 мг/кг амфедазол максимально снижал исследуемый показатель на 20,12% на 5-й минуте (суммарная доза 0,75 мг/кг) ( $p < 0,05$ ). При этом артериальное давление не изменялось, частота сердечных сокращений, начиная с 10 минуты введения, уменьшалась на 15,4% ( $p > 0,05$ ).

При постоянной внутривенной инфузии со скоростью 0,3 мг/кг исследуемое вещество изменяло средняя величина подъема сегмента ST более длительно начиная с 1-й минуты. Максимальное статистически достоверное снижение показателя (в среднем на 41%) происходило на 7-й минуте (суммарная доза 2,1 мг/кг). Системное артериальное давление снижалось в среднем на 30 мм рт. ст., частота сердечных сокращений, начиная с 10 минуты введения, уменьшилась на 34,5% ( $p < 0,05$ ).

Амиодарон, вводимый на фоне ишемии миокарда, снижал суммарный прирост сегмента ST, начиная с 1-й минуты, статистически достоверно по отношению к исходному уровню ишемии. Максимальное статистически достоверное снижение показателя на 41% происходило на 5-7-й минутах.

В отличие от амфедазола, при введении амиодарона системное артериальное давление практически сразу снизилось в среднем на 45 мм рт. ст., а к концу эксперимента резко упало и составляло 55 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений уменьшилась, начиная с 10 минуты введения, в 2 раза ( $p < 0,05$ ). Подобный эффект амиодарона, вероятно, связан с достаточно высокими дозами, скоростью введения и проявлением кардиотоксических свойств.

Для определения терапевтического индекса была рассчитана величина  $ED_{40}$  – доза, в которой снижение подъема среднего сегмента ST составляло 40%. Для амфедазола и амиодарона она равна 2,1 и 25,0 мг/кг соответственно (табл. 4.6). Изучаемое вещество превосходило амиодарон по величине  $ED_{40}$  в 12 раз, по терапевтическому индексу – в 1,5 раза.

Таким образом, в экспериментах по изучению влияния на течение ишемического повреждения миокарда при окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии амфедазол и амиодарон проявили противоишемический эффект. При этом изучаемое соединение превосходит амиодарон как по абсолютным ( $ED_{40}$ ), так и относительным показателям эффективности (терапевтический индекс). При этом изучаемое вещество в

меньшей степени, чем амиодарон, изменяло системное артериальное давление.

Таблица 4.6

**Противоишемическая активность (ЕД<sub>40</sub>), ЛД<sub>50</sub>, и терапевтический индекс амфедазола и амиодарона в условиях регулируемой окклюзии левой нисходящей ветви коронарной артерии у кошек**

№	Вещество	ЕД <sub>40</sub> (мг/кг, в/в)	ЛД <sub>50</sub> , (мг/кг, в/в)	Терапевтический индекс, ЛД <sub>50</sub> / ЕД <sub>40</sub>
1.	Амфедазол	2,1	17,0	8,1
2.	Амиодарон	25,0	135,5*	5,4

\* - по данным Beckers (1987)

#### 4.6. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АМФЕДАЗОЛА

Кардиопротекторное действие амфедазола обусловлено антиремоделирующими, а именно антифибрилляторными и противоишемическими свойствами.

Вещество ограничивает электрофизиологическое ремоделирование. Об этом свидетельствуют следующие данные:

- оказывает непосредственное дозозависимое блокирующее влияние в отношении калиевых токов, изученные *in vitro* в условиях фиксации потенциала;
- проявляет выраженную антифибрилляторную активность *in vivo* на моделях суправентрикулярных и вентрикулярных фибрилляций, в том числе при ишемическом повреждении миокарда;
- обладает высокой способностью увеличивать порог фибрилляций желудочков и снижать максимально воспроизводимую частоту, что косвенно свидетельствует о влиянии на эффективный рефрактерный период и возбудимость миокарда.

В основе механизма действия лежит удлинение фаз 2 и 3 реполяризации и соответственно увеличение общей продолжительности потенциала действия кардиомиоцитов за счет блокады калиевых каналов. В высоких концентрациях изучаемое вещество может оказывать влияние на фазу быстрой деполяризации (фаза 0 потенциала действия), так как в ее формировании в пейсмейкерных клетках участвуют ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Снижение частоты синусового ритма под действием амфедазола может быть связано с угнетением ионных токов фазы 4 потенциала действия (спонтанной диастолической

деполяризации), определяющих автоматическую функцию синусового узла. Т.о. можно предположить амиодароноподобный механизм действия, а соединение может быть отнесено к III классу антиаритмических препаратов по классификации Vaughan Williams в модификации D.S.Harrison [1985].

#### 4.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что амфедазол обладает выраженным антифибрилляторным действием и превосходит препарат сравнения амиодарон по своей активности.

Так на модели фибрилляции предсердий, вызванных электростимуляцией, вещество при внутривенном введении ( $M\bar{E}K=0,91$  мг/кг) в 100% случаев восстанавливало синусовый ритм, превосходило амиодарон как по показателям минимальной эффективной дозы (в 8,5 раза), так и величине терапевтического индекса.

На экспериментальной модели фибрилляции, вызванной внутривенным введением аконитина, амфедазол оказался активнее амиодарона как по величине  $ED_{50}$  (0,3 мг/кг) в 33,3 раза, так и по терапевтическому индексу в 4,2 раза.

На модели кратковременной ишемии/реперфузии миокарда амфедазол при профилактическом введении за 5 минут до реперфузии предотвращал развитие постреперфузионных фибрилляций ( $ED_{50}=0,2$  мг/кг) и оказался активнее амиодарона как по величине  $ED_{50}$  в 9 раз, так и по терапевтическому индексу на 13%.

Амфедазол повышал порог фибрилляций желудочков, вызванных электрической стимуляцией, и снижал максимально воспроизводимую частоту. В дозах, эквивалентных  $1/5-1/6$   $LD_{50}$ , исследуемое соединение превосходило лидокаин как по абсолютной величине повышения порога электрических фибрилляций в 3 раза, так и по длительности антифибрилляторного эффекта в 3-4 раза. амфедазол во всех дозах статистически достоверно снижало максимально воспроизводимую частоту сердцебиений на 40%. Несмотря на примерно одинаковую силу действия лидокаина и амфедазола, эффект второго был более длительным (в 2 раза).

В экспериментах по изучению влияния на течение ишемического повреждения миокарда при дозируемой окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии амфедазол проявил противоишемический эффект. Изучаемое вещество превосходило

амиодарон по величине  $ED_{40}$  (2,1 мг/кг) в 12 раз, по терапевтическому индексу – в 1,5 раза.

Таким образом, амфедазол оказывает антиремоделирующее действие. Его можно отнести к антиаритмическим препаратам III класса со сложным мембранотропным действием, обладающим выраженными антифибрилляторными и умеренными противоишемическими свойствами. Соединение является перспективным для дальнейшего изучения его антиаритмических свойств с целью решения проблемы недостаточной эффективности терапии аритмий.

## ГЛАВА 5. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИФОСФОДИЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Сердечная недостаточность (СН) - наиболее частый исход большинства сердечно-сосудистых заболеваний – в развитых странах является одним из самых распространенных патологических состояний. Количество пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) в США составляет 2,2%, в европейской популяции достигает 2%, а в России – 6% и значительно увеличивается с возрастом [Абдюкова, 2010; Мареев, 2013; Tamargo, 2009; Liu1, 2013]. Регулярная коррекция симптомов СН требуется более чем у 45% пациентов, перенесших инфаркт миокарда, и у 46% больных с неконтролируемой артериальной гипертензией [Решетько, 2003; Janssens, 2012]. В экономически развитых странах ее распространенность за последние 20 лет достигла такого уровня, что позволяет говорить о надвигающейся эпидемии ХСН [Сидоренко, 2005; Trochu, 2009; Coons, 2011].

Крупномасштабные рандомизированные исследования, выполненные в последние десятилетия, позволили уточнить место различных лекарственных препаратов в медикаментозной терапии больных с ХСН [Беленков, 2008; Сидоренко, 2005; Мареев, 2013; Bangash, 2012; Ezekowitz, 2013; Francis, 2014].

Создание негликозидных инотропных препаратов, в т. ч. производных катехоламинов (допамин, добутамин), стимуляторов  $\beta$ -адренорецепторов (преналтерол, ксамотерол), нескольких поколений ингибиторов фосфодиэстеразы (амринон, милринон, эноксимон, веснаринон), сенситизаторов кальция (пимобендан, левосимендан) позволило достигать гораздо большего возрастания сократимости миокарда, чем при использовании гликозидов, не вызывая побочных реакций, свойственных последним [Сидоренко, 2005; Бакшеев, 2007; Беленков, 2008; Моисеев1, 2009; Adawa, 1986; Farah, 1986; Ding, 2005; Perrone, 2005; Endoh, 2006; Hasenfuss, 2011; Francis, 2014]. Интерес представляют также препараты с множественными механизмами действия (ингибиторы ФДЭ и сенситайзеры к ионам кальция) типа левосимендана [Павликова, 2005, 2006; Белоусов, 2006; Моисеев1, 2009; Мареев, 2013; Endoh, 2008; Ambrosio, 2009; Parissis, 2010; Rognoni, 2011].

Основным показанием к назначению негликозидных инотропных препаратов является неотложная медицина: нарушение кровообращения при острой СН различного

генеза, шок, остановка сердца, декомпенсация хронической СН, острый инфаркт миокарда, сепсис, полиорганная недостаточность, тяжелые пороки сердца, постперфузионный синдром в кардиохирургии и другие [Гуревич, 2008; Bangash, 2012].

Однако многочисленные исследования показали, что использование негликозидных инотропных препаратов в лечении ХСН возможно лишь в виде коротких курсов, когда резкое повышение сердечного выброса позволяет добиться увеличения диуреза и выведения пациента из состояния тяжелой декомпенсации [Chatterjee, 2003; Отрохова, 2007; Movsesian, 2009]. Продолжительное применение негликозидных инотропных стимуляторов оказывает негативное влияние на прогноз больных ХСН, что было доказано в 11 многоцентровых двойных слепых рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях [Беленков, 2008; Моисеев2, 2011; Teerlink, 2009a,b; Metra, 2011a,b; McCann, 2012].

Существует острая клиническая потребность в препаратах, которые улучшают сердечную производительность, с благоприятным уровнем безопасности. В последнее время появилось много новых положительных инотропных средств с различным механизмом действия и характерным электрофизиологическим профилем. Наибольший интерес представляют соединения, как (I) истароксим - негликозидный ингибитор натрий-калий-АТФ-азы с дополнительным стимулирующим действием на кальциевый насос саркоплазматического ретикулума (SERCA), который показал лузитропное<sup>1</sup> и инотропное свойства в экспериментальных и ранних клинических исследованиях; (II) активаторы миозина кардиомиоцитов; (III) подходы генной терапии для увеличения SERCA2a миокарда; (IV) разработка нитроксильных доноров с доказанными положительными инотропным и лузитропным, а также выраженным сосудорасширяющим эффектами; (V) стабилизаторы рианодиновых<sup>2</sup> рецепторов, уменьшающие патологическую утечку кальция из саркоплазматического ретикулума; (VI) метаболические модуляторы энергии [Гуревич, 2008; Endoh, 2008; Teerlink, 2009a,b; Tamargo, 2011; Garg, 2013; Liu1, 2013; Francis, 2014].

В России к Перечню жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов из негликозидных кардиотонических средств относятся добутамин, допамин,

<sup>1</sup> Положительное лузитропное действие – способность миокарда к быстрому расслаблению.

<sup>2</sup> Рианодиновые рецепторы – лигандуправляемые - располагаются в мембране саркоплазматического ретикулума. Обеспечивают быстрое освобождение ионов кальция из внутриретикулярного пространства в цитоплазму и сопряжение потенциала действия с мышечным сокращением.



норэпинефрин, фенилэфрин, эпинефрин, левосимендан [Распоряжение Правительства РФ от 19.12.2013 N 2427-р; Распоряжение Правительства РФ от 7.12.2011 г. N 2199-р] и нет аналогов группе препаратов - ингибиторов ФДЭ.

Повторный интерес к этому классу инотропных средств возрос благодаря тому, что у ингибиторов ФДЭ нового поколения выявлена кардиопротекторная активность. Предполагаемые защитные механизмы действия от вызываемого ишемией-реперфузией повреждения кардиомиоцитов ингибиторов миокардиальной ФДЭ3 и ФДЭ4 связаны с тем, что они могут увеличить активность протеинкиназы А (РКА) ведущей к фосфорилированию eNOS и p38 MAPK. Активация p38 MAPK может потенциально привести к транслокации белка теплового шока ((heat shock protein) Hsp27) в Z-диске, что может стабилизировать цитоскелет и сократительные волокна [Rao, 2009; Osadchii, 2007a,b].

Ранее в исследованиях *in silico* и *in vitro* (глава 2.5.) было найдено соединение РУ-539 - бромид 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия с кардиотонической активностью. Вещество вызывало дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения, оказалось активнее амринона и превосходило его как по величине IC<sub>50</sub> в 6 раз, так и по терапевтическому индексу – в 1,8 раза. Механизм действия его связан с блокадой миокардиальной ФДЭ [Ларионов, 1988].

Для подтверждения кардиопротекторных свойств соединения РУ-539 необходимо было изучить его влияние на сократительную активность и функциональные резервы сердца в условиях инфаркта миокарда.

## 5.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводились в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств [Тюренков, 2012].

Эксперименты выполнены на 24 белых неинбредных крысах-самках (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН, ветеринарное свидетельство 247 № 0080153 от 28.11.2012) массой 280-320 г. Условия содержания и проведения исследований более подробно описаны в главе 2.1. Все эксперименты были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 года).

Изучение влияния соединений на сократительную активность и функциональные резервы [Меерсон, 1984] сердца проводили у животных в условиях острой интоксикации изопротеренолом [Ковалев, 1988] (изопреналина (ISO) гидрохлорид (SIGMA, США), подкожно дважды с интервалом 24 часа в дозе 80 мг/кг). Интактным животным вводили изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентных объемах. Исследования проводили на 3-е сутки.

Животные были разделены на 4 группы: 1 группа (n=6) – контроль - «*интактные*» - животные без патологии, которым вводили физиологический раствор; 2 группа (n=6) – «*контроль-ISO*» - животные с изопротереноловым повреждением миокарда, которым вводился физиологический раствор; 3 группа (n=6) – опыт – «*ISO-PY-539*» - животные с патологией, которым вводилось соединение PY-539; 4 группа (n=6) – контроль – «*ISO-амринон*» - животные с патологией, которым вводился препарат сравнения амринон (SIGMA, США) - негликозидый ингибитор ФДЭ. Введение исследуемых веществ осуществляли через катетер, имплантированный в правую наружную яремную вену.

В условиях наркоза (хлоралгидрат («Panreac», Испания), внутривенно, 400 мг/кг), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии проводили катетеризацию левого желудочка. Артериальное давление измеряли в левой общей сонной артерии.

Изучение влияния вещества на функциональные резервы сердца осуществлялось на крысах с использованием нагрузочных проб [Меерсон, 1984; Тюренков, 1981, 2005, 2012]: ***изменение преднагрузки*** и ***постнагрузки*** (более подробно описано в главе 3.1.) и ***на адренореактивность*** - дозированной стимуляции адренорецепторов сердца – введение адреналина (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия); 0,1 мл (в разведении  $1 \times 10^{-7}$  г/мл) на 100 г массы животного.

Регистрация основных показателей кардио- и гемодинамики (максимального левожелудочкового давления ( $ЛЖД_{\max}$ ), скорости сокращения и расслабления миокарда ( $dp/dt+$  и  $dp/dt-$ ), частоты сердечных сокращений (ЧСС), систолического ( $АД_{\text{сист}}$ ), диастолического ( $АД_{\text{диаст}}$ ), среднего артериального давления ( $АД_{\text{ср}}$ )) осуществлялась электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт.ст.) с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе

программы BEAT (Москва, Россия). Максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) определяли расчетным способом ( $\text{ЛЖД}_{\text{макс}} \times \text{ЧСС} / (\text{масса левого желудочка} + 1/3 \text{ межжелудочковой перегородки})$ ).

Исследуемые соединения вводили внутривенно в дозе, эквивалентной 2  $\text{IC}_{50}$  рассчитанной в исследованиях на изолированных предсердиях (см. табл. 2.16), что составило 0,42 мг/кг для соединения РУ-539 и 0,94 мг/кг для амринона. Через 5 минут после введения исследуемых веществ и записи исходных показателей животным проводили нагрузочные пробы.

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Выполняли расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $M$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ). Проверку выборки на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили с помощью непараметрического парного теста Вилкоксона. Сравнение трех и более независимых выборок проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

## **5.2. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-539 НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА В УСЛОВИЯХ НЕКОРОНАРОГЕННОГО НЕКРОЗА**

В основе острого изопротеренолового (ISO) повреждения миокарда лежит некоронарогенный некроз миокарда. Показано, что при подкожном введении высоких доз ISO (20-100 мг/кг) в течение 1-3 дней у крыс развиваются симптомы, подобные инфаркту миокарда [Назипова, 1998; Казаченко, 2008; Scheuer, 1999; Senthil, 2007; Osadchii, 2007a,b; Mehdizadeh, 2013]. Высокие дозы ISO приводят к значительной тахикардии, связанной с пониженным давлением крови в аорте. Развивается несоответствие между увеличенной потребностью миокарда в кислороде и снижением коронарного кровотока. Происходит усугубление ишемии, некроз кардиомиоцитов продолжается. При этом страдает сократительная активность и могут появиться симптомы острой сердечной

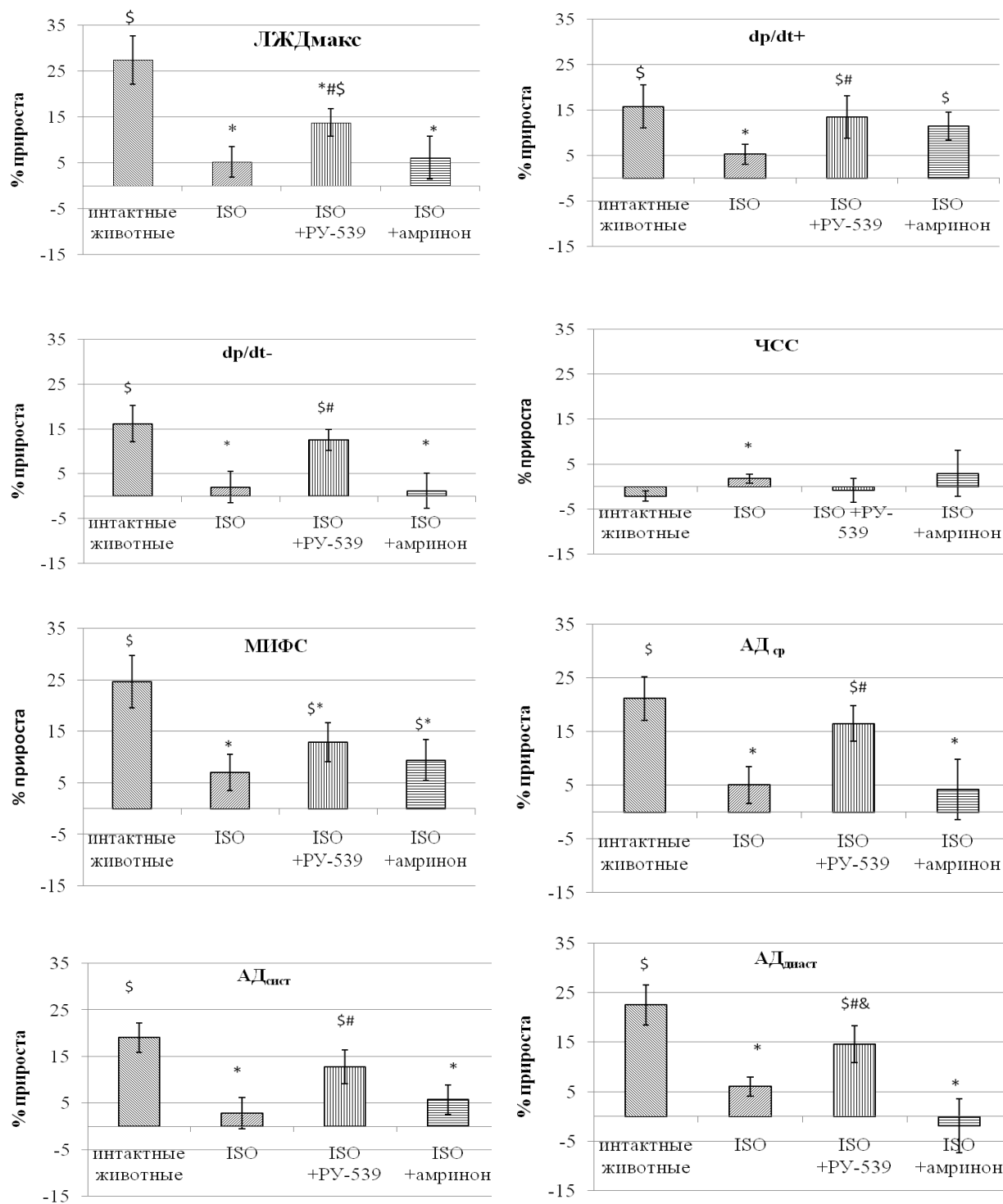
недостаточности. Повреждение миокарда приводит к его гипертрофии, о чем свидетельствует увеличение веса левого желудочка и утолщение волокон. Однако, в данном случае, гипертрофия рассматривается как вторичный репаративный процесс, направленный на компенсацию нарушенной систолической функции при инфаркте миокарда [Osadchii, 2007a,b].

При оценке исходных показателей кардио- и гемодинамики у животных всех групп (2-4) с изопротереноловым повреждением миокарда наблюдали более низкий уровень ИФС по отношению к «интактным» животным (приложения 27-29).

При проведении функциональных нагрузок у животных экспериментальных групп были выявлены различия в кардио- и гемодинамических эффектах. Динамика основных показателей представлена в приложениях 26-37 и на рисунках 5.1.-5.3.

При увеличении преднагрузки (**тест нагрузка объемом**) у интактных животных  $LЖД_{\max}$  возрастало максимально на 27,4% на 15-ой секунде наблюдения, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 15,73%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 16,18% по сравнению с исходными данными (приложение 26, рис. 5.1).  $АД_{\text{сист}}$  повышалось на 19,05%,  $АД_{\text{диаст}}$  – на 22,5%,  $АД_{\text{ср}}$  – на 21,14%. ЧСС при этом практически не изменялась. Максимальный относительный прирост индекса интенсивности функционирования структур (МИФС) составил 30,3%.

У животных контрольной группы с изопротереноловой ишемией миокарда при увеличении преднагрузки реакция практически отсутствовала. На 15-ой секунде  $LЖД_{\max}$  возрастало на 5,16%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 5,27%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 5,18%, МИФС – на 7,03%.  $АД_{\text{сист}}$ ,  $АД_{\text{диаст}}$ ,  $АД_{\text{ср}}$  поднимались в пределах 5% по сравнению с исходными данными (приложение 27, рис. 5.1). Изменения ЧСС не наблюдали. Прирост МИФС составил 6%. Максимальный прирост основных показателей животных с патологией ( $LЖД_{\max}$ ,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , МИФС,  $АД_{\text{сист}}$ ,  $АД_{\text{диаст}}$ ,  $АД_{\text{ср}}$ ) был статистически достоверно ниже чем у интактных животных в 5,3; 3,0; 3,1; 4,3; 6,8; 3,7; 4,2 раза соответственно.



**Рис. 5.1. Влияние соединения PY-539 (0,42 мг/кг) и амринона (0,94 мг/кг) на показатели кардио- и гемодинамики в тесте нагрузки объемом у животных с острой интоксикацией изопроterenолом**

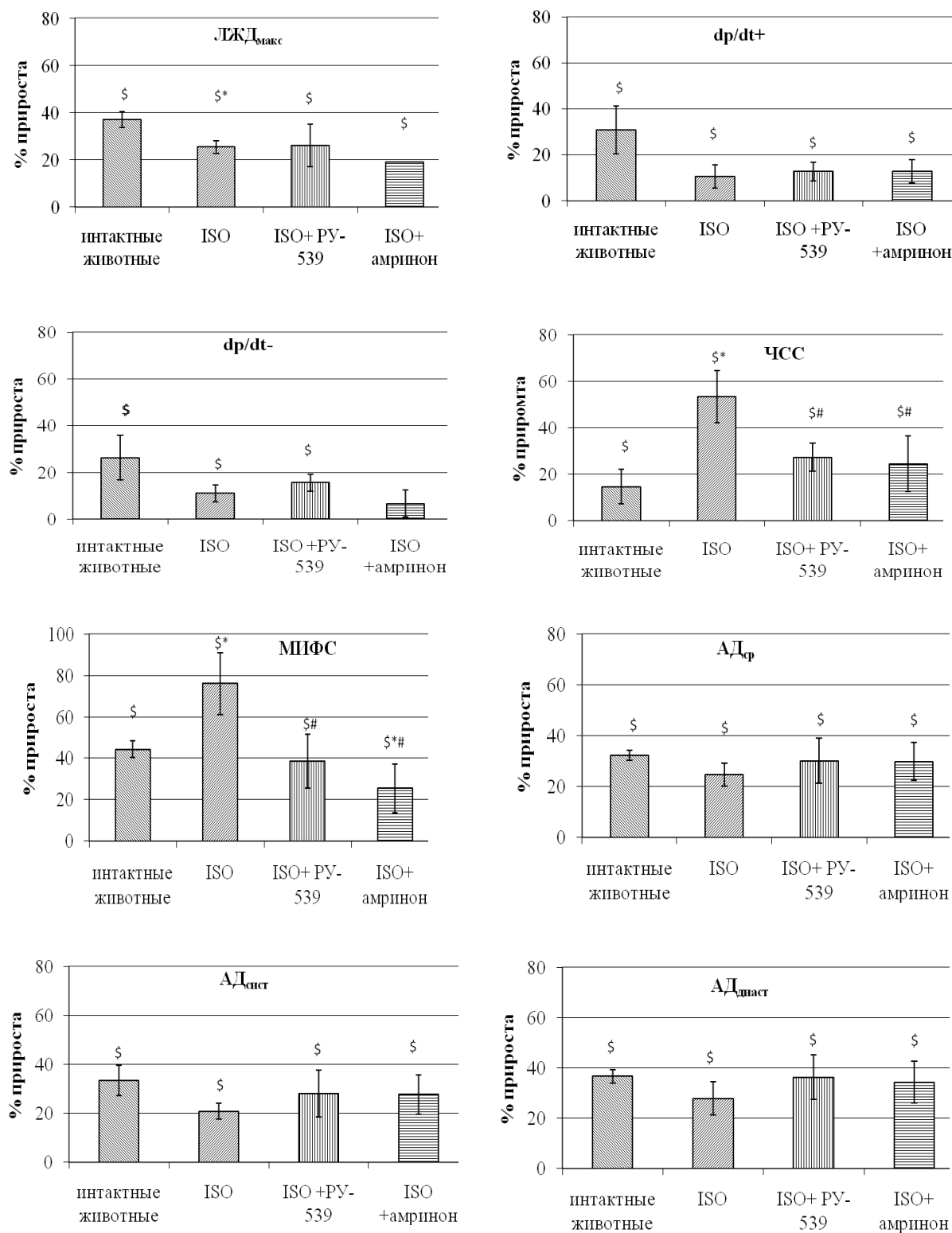
Примечания: \$ - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными своей группы (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ); различия статистически значимы к \* - интактным животным, # - группе «ISO», & - группе «ISO+PY-539» (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

Соединение РУ-539 в условиях проведения нагрузки объемом статистически значительно улучшало сократимость миокарда животных с изопротереноловым повреждением: ЛЖД<sub>макс</sub> возрастало максимально на 13,76% на 15-ой секунде наблюдения, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 13,42%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 12,57% (приложение 28, рис. 5.1). АД<sub>сист</sub> максимально увеличилось на 12,78%, АД<sub>диаст</sub> – 14,6%, АД<sub>ср</sub> – 16,47% по сравнению с исходными данными ( $p < 0,05$ ). ЧСС практически не изменялась. Максимальный относительный прирост МИФС составил 15,03%.

У животных с изопротереноловым повреждением миокарда, которым за 5 минут до проведения преднагрузки вводили амринон, на 15-ой секунде наблюдения ЛЖД<sub>макс</sub> возрастало максимально на 9,12%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 11,47%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 7,22% (приложение 29; рис. 5.1). Изменений ЧСС практически не было. Прирост МИФС был равен 8,79%. Динамика АД<sub>сист</sub> и АД<sub>ср</sub> не отличалась от таковой контрольной группы с ISO: максимальный подъем при нагрузке не превышал 5%. Диастолическое давление не изменялось, что, вероятно, связано с вазодилатирующими свойствами амринона.

Таким образом, показано, что при увеличении преднагрузки соединение РУ-539 улучшает сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией. О чем свидетельствует статистически значимое увеличение ЛЖД<sub>макс</sub>,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , а также АД<sub>сист</sub>, АД<sub>диаст</sub>, АД<sub>ср</sub> в 2,7; 2,6; 2,4; 4,2; 2,4; 2,3 раза соответственно, в группе животных, получавших вещество по сравнению с контрольной группой с ISO. Эффекты соединения РУ-539 превосходили таковые у амринона по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,88%,  $dp/dt+$  на 17,00%,  $dp/dt-$  на 74,09%, МИФС на 70,99%.

При проведении **теста на адренореактивность** у интактных животных на 15-ой секунде наблюдения ЛЖД<sub>макс</sub> возрастало максимально на 37%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – на 31%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – на 27%, ЧСС – на 15%, АД<sub>ср</sub> – на 32% по сравнению с исходными данными (приложение 30, рис. 5.2). Прирост МИФС составил 44%. У всех животных с изопротереноловой ишемией (группы 2-4) при проведении данной нагрузки реакция была практически в 1,5-2 раза ниже по сравнению с контрольными. По показателям сократимости статистически значимых межгрупповых различий у животных с патологией не выявлено (приложения 31-33, рис. 5.2).



**Рис. 5.2. Влияние соединения PY-539 (0,42 мг/кг) и амринона (0,94 мг/кг) на максимальные показатели кардио- и гемодинамики в тесте на адренореактивность у животных с острой интоксикацией изопротеренолом**

Примечания: \$ - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными своей группы (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ); различия статистически значимы к\* - интактным животным, # - группе «ISO» (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

Однако при сходной сократимости во всех группах (2-4), у животных контрольной группы наблюдалась выраженная тахикардия: прирост ЧСС составил более чем 50% и был статистически значим как по отношению к интактным, так и к животным, получавшим изучаемые соединения. Это приводило к большому приросту интенсивности функционирования структур: МИФС увеличилась на 80%, что свидетельствует о росте потребности миокарда в кислороде и утяжелении экспериментальной ишемии.

Соединение РУ-539 и амрион (группа 3-4) у животных с изопротереноловой ишемией ограничивали развитие тахикардии на введение адреналина ( $p < 0,05$  по отношению к контролю) (приложения 32-33, рис. 5.2). ЧСС в среднем увеличилась только на 25%. При сократимости, схожей с группой контроля с ISO, индексы МИФС в этих группах оказались подобно интактным животным и статистически значимо отличались от контрольных. Данный эффект свидетельствует об их противоишемическом и кардиопротекторном действии. При сравнении результатов изучаемых соединений между собой было показано, что вещество РУ- 539 превосходило амрион по максимальным показателям прироста ЛЖД и скорости расслабления в 1,4 и 2,4 раза соответственно.

При оценке гемодинамических эффектов в тесте на адренореактивность было выявлено отсутствие во всех экспериментальных группах (1-4) значимых различий в изменении АД (приложения 30-33, рис. 5.2). При этом выявлена тенденция к меньшему приросту АД у животных контрольной группы с патологией. Соединение РУ-539 и амрион способствовали повышению данного показателя у животных с изопротереноловой ишемией миокарда.

Таким образом, при проведении теста на адренореактивность у животных с изопротереноловым повреждением миокарда было показано, что соединение РУ-539 значимо ограничивало чрезмерный рост ЧСС и МИФС по отношению к контролю и превосходило амрион по максимальным значениям прироста ЛЖД и  $dp/dt$ - в 1,4 и 2,4 раза соответственно.

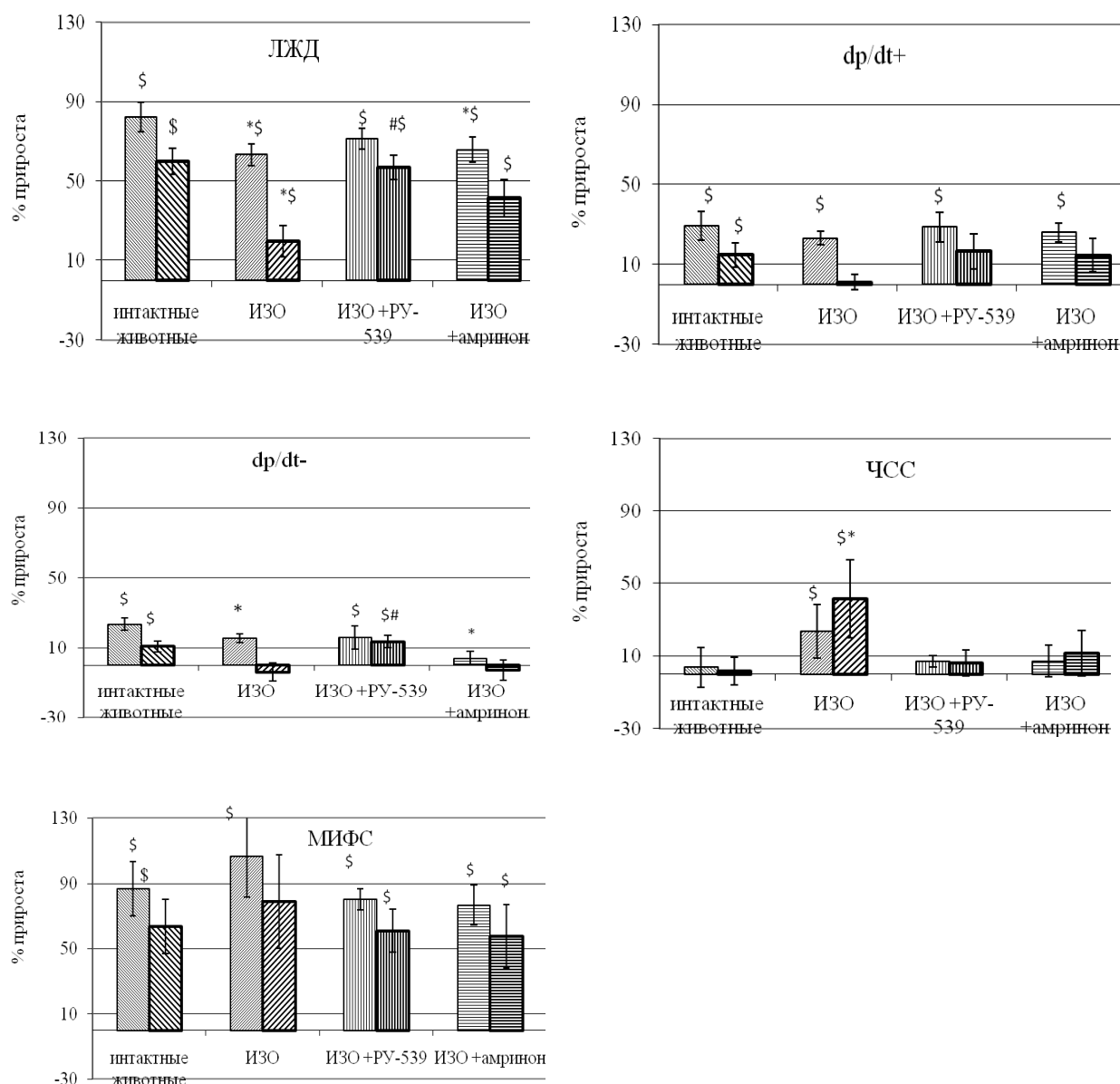
При увеличении постнагрузки (проведение **теста максимальной изометрической нагрузки**) у животных интактной группы наблюдали выраженные кардиодинамические эффекты, которые устойчиво сохранялись на протяжении всего периода пережатия аорты (приложение 34, рис. 5.3). Так на 5-ой секунде наблюдения прирост  $ЛЖД_{\text{макс}}$  составил



82,27%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – 29,18%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда – 23,33%, ЧСС практически не изменялась по сравнению с исходными данными. МИФС увеличилась на 86,67%. К 25-ой секунде пережатия аорты данные показатели прироста остались достаточно высоки и для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , МИФС составили 60,1; 14,7; 10,8; 63,7% соответственно.

У животных контрольной группы с изопротереноловой ишемией при проведении данной нагрузки реакция была значительно ниже и более кратковременна по сравнению с интактными (приложение 35, рис. 5.3). Так, на 5-ой секунде наблюдения прирост ЛЖД<sub>макс</sub> составил 63,3%, скорость сокращения ( $dp/dt+$ ) – 23,16%, скорость расслабления ( $dp/dt-$ ) – 15,58%. Для ЛЖД<sub>макс</sub> и  $dp/dt-$  данные различия были статистически значимы по отношению к интактным. Однако к 25-й секунде показатели сократимости резко снизились. Прирост ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  составил 19,9; 1,1; -4,0% соответственно и статистически значимо отличался от интактных в 3,0; 13,4 и 3,7 раза. При этом у животных данной группы наблюдалась выраженная тахикардия: ЧСС статистически значимо по отношению к интактным животным увеличилась от 24% в начале нагрузки до более чем 40% в конце. Подобные изменения кардиодинамики приводили к большому приросту интенсивности функционирования структур (МИФС составила 106,52%), но это означало повышение потребности миокарда в кислороде и утяжеление экспериментальной ишемии.

После введения соединения РУ-539 животным с изопротереноловой ишемией миокарда при проведении изометрической нагрузки максимальный прирост ЛЖД<sub>макс</sub>,  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  на 5-ой секунде наблюдения составили 71,29; 28,74 и 15,81% соответственно. Кардиодинамическая реакция устойчиво сохранялась в течение всей нагрузки и к 25 секунде пережатия аорты данные показатели остались достаточно высоки: для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  составили 56,9; 16,5; 13,4% соответственно, что превосходило эффекты животных контрольной группы в 2,9; 15,0; 4,4 раза. Различия в динамике показателей ЛЖД<sub>макс</sub> и  $dp/dt-$  на 25-й секунде наблюдения оказались статистически значимыми по отношению к контрольным животным с патологией. ЧСС практически не изменялась по сравнению с исходными данными. МИФС на 5-й секунде составила 88,32%, на 25-й секунде - 60,9% (приложение 36, рис. 5.3).



**Рисунок 5.3. Влияние соединения РУ-539 (0,42 мг/кг) и амринона (0,94 мг/кг) на показатели кардиодинамики в тесте с максимальной изометрической нагрузкой у животных с острой интоксикацией изопротеренолом.**

Примечания: \$ - различия статистически значимы по сравнению с исходными данными своей группы (парный тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ); различия статистически значимы к \* - интактным животным, # - группе «ИЗО», & - группе «ИЗО+РУ-539» (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

В каждой группе первый столбик: максимальный эффект на 5 секунде; второй столбик: эффект в конце нагрузки.

У животных с изопротереноловой ишемией после введения амринона в условиях проведения данной нагрузки на 5-й секунде максимальный прирост ЛЖД составил 65,81%, скорости сокращения ( $dp/dt+$ ) – 25,96%, скорости расслабления – 3,9%, (приложение 37, рис.

5.3). Кардиодинамическая реакция к концу периода наблюдения (25 секунд) уменьшилась и прирост для ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$  составил 41,5; 14,6; -2,95% соответственно, что превосходило прирост таковых показателей у животных контрольной группы в 2,0; 13,0; 1,4 раза. ЧСС возросло на 12,0%. Максимальный относительный прирост МИФС составил 76,52%, в конце нагрузки - 57,5%.

Таким образом, было показано, что при увеличении постнагрузки соединение РУ-539 сохраняет сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией на достаточно высоком уровне, то есть способствует увеличению функциональных резервов сердца. Основные показатели сократимости к концу нагрузки (ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ ) в группе животных, получавших изучаемое вещество, статистически значимо превосходили таковые у контрольных животных с изопротеренолом в 2,9; 15,0; 4,4 раза. Соединение РУ-539 в условиях проведения максимальной изометрической нагрузки у животных с изопротереноловой ишемией превосходит амрион по способности длительно удерживать нагрузку на достаточно высоком уровне.

### **5.3. МЕХАНИЗМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-539**

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии у производного бензимидазола - соединения РУ-539 – кардиотонических и кардиопротекторных свойств.

Ранее в исследованиях *in vitro* на гомогенате кардиомиоцитов кролика [Ларионов, 1988] было показано, что вещество в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М ингибирует активность ФДЭ на 66,7%.

При изучении влияния соединения РУ-539 на сократительную активность изолированных предсердий крыс в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-5}$  М было показано дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения ( $IC_{50} = 4,20 \times 10^{-7}$  М.)

В исследованиях *in vivo* у животных с изопротереноловой ишемией миокарда соединение РУ-539 в дозе 0,42 мг/кг при проведении функциональных тестов приводило к улучшению сократимости миокарда в систолу и скорости его расслабления в диастолу. Обращает на себя внимание тот факт, что изучаемое вещество улучшает диастолическую функцию более выражено, чем препарат сравнения амрион. Известно, что быстрое и полное расслабление является необходимым условием для сердечного выброса, адаптации к

изменениям в условиях нагрузки, инотропной стимуляции и частоты сердечных сокращений [Chemla, 2000] и является свидетельством наличия кардиопротекторного действия. Соединение РУ-539 при проведении функциональных тестов не только улучшало сократительную активность миокарда, но и способствовало повышению функциональных резервов, о чем свидетельствует увеличение МИФС без дополнительного увеличения ЧСС за счет повышения ЛЖД.

#### 5.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было найдено соединение РУ-539, обладающее положительным инотропным и кардиопротекторным свойствами.

Было показано, что изучаемое вещество повышает сократимость миокарда как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*. При изучении влияния на сократительную активность изолированных предсердий крыс соединение РУ-539 превосходило амринон по величине  $IC_{50}$  в 6 раз, по терапевтическому индексу – в 1,8 раза.

В исследованиях *in vivo* в условиях изопротереноловой ишемии миокарда соединение РУ-539 в дозе 0,42 мг/кг при проведении функциональных тестов способствовало увеличению сократимости миокарда в систолу и скорости его расслабления в диастолу у животных с патологией. В условиях нагрузки объемом изучаемое вещество превосходило амринон по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,88%, скорости увеличения сократимости миокарда на 17% и скорости его расслабления на 74,09%, по динамике МИФС на 70,99%. В тесте на адренореактивность соединение РУ-539 превосходило амринон по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости расслабления, МИФС в 1,4; 2,4 и 1,5 раза соответственно, ограничивало развитие тахикардии на введение адреналина. При проведении теста постнагрузки по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости сокращения, ЧСС и МИФС соединение РУ-539 оказало эффект подобный амринону и превосходило его по способности сохранять сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией на достаточно высоком уровне. Изучаемое вещество при введении животным с изопротереноловой ишемией миокарда способствовало увеличению функциональных резервов сердца без увеличения ЧСС, улучшало диастолическую функцию.

## ГЛАВА 6. КАРДИАЛЬНЫЕ И НЕКОТОРЫЕ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗУЧАЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ

При проведении токсикологических исследований кардиотропных соединений в первую очередь имеет значение определение острой токсичности для оценки широты терапевтического действия, позволяющей варьировать диапазон доз и обеспечивать хорошую переносимость, а так же изучение кардиальных и экстракардиальных побочных эффектов в эффективных дозах [Метелица, 2005; Моисеев2, 2010а,б]. Из кардиальных побочных эффектов наибольшее значение имеют аритмогенный и кардиодепрессивный. Причем, аритмогенный эффект может наблюдаться при субтерапевтической, терапевтической и токсической концентрациях препаратов в крови, а также зависит от дозы и скорости их введения и не зависит от длительности применения. Экстракардиальные токсические эффекты чаще всего проявляются при длительном применении препаратов и ограничивают применение их в клинической практике.

Известно, что при высокой эффективности кордарона в 60-90% случаев различных нарушений ритма [Голицин, 2003, 2011; Гиляров, 2006; Канорский, 2007; Моисеев2, 2010а,б], побочные эффекты, потребовавшие отмены кордарона составили по данным разных авторов: аритмогенный – 0-7%, другие кардиогенные и некардиогенные – 11,5-27% [Фисенко, 2003; Моисеев2, 2012аб; Santangeli, 2012; Burra, 2013]. Согласно данным мета-анализа побочных эффектов низких доз кордарона, число случаев вынужденного прекращения приема его было приблизительно в 1,5 раза выше, чем в группе плацебо [Моисеев, 2009]. Такая вероятность побочных эффектов серьезно ограничивают применение этого препарата.

Среди ингибиторов NHE-1, достигших клинических испытаний, известен зонипорид [Guzman-Perez, 2001; Tracey, 2003]. Однако у него был выявлен риск повреждения периферической нервной системы [Pettersen, 2008], что может ограничить не только широту терапевтического действия, но и применение данного препарата.

Поэтому были проведены исследования общетоксикологических свойств и кардиальных побочных эффектов в эффективных дозах (табл. 6.1), а также острой токсичности соединений-лидеров.

Таблица 6.1

**Диапазон эффективных доз наиболее активных кардиопротекторных веществ, производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, по данным фармакодинамических исследований**

№	Вещество	Инотропная активность на изолированных предсердиях, 2 E/D <sub>50</sub> , мг/кг	Фибрилляции, вызванные электрической стимуляцией предсердий, МЭД, мг/кг	Фибрилляции, вызванные внутривенным введением аконитина, E/D <sub>50</sub> , мг/кг	Противоишемические дозы, мг/кг	Постреперфузионные желудочковые нарушения ритма, E/D <sub>50</sub> , мг/кг	Антигипертрофическая активность при ХСН, мг/кг
1.	Соединение РУ-1355	-	-	-	1,12*	1,25*; в/в	1,25-5,0*
2.	Амфедазол	-	0,9**; в/в	0,3*; в/в	0,75-2,1**	0,2*; в/в	
3.	Соединение РУ-539	0,42*	-	-	-	-	

\* - крысы; \*\* - кошки

## 6.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 24 мышах-самках и 150 мышах-самцах массой 18-22 г, 80 белых неинбредных крысах-самцах массой 200-400 г и 40 кошках обоего пола 2,5-3,5 кг. Условия содержания и проведения исследований более подробно описаны в главе 2.1.

Изучение **общетоксикологических свойств** проводили с использованием схемы многотестового наблюдения по Irwin [1964].

Для соединения РУ-1355 исследования проводили на 24 мышах-самках массой 18-22 г. Животные были распределены на 4 группы: 1 и 3 группы - «контрольные» - животным внутрибрюшинно вводили изотонический раствор натрия хлорида 0,1 мл/10 г веса, 2 и 4 группы - «опытные» - внутрибрюшинно однократно вводили изучаемое вещество в эквимоларной эффективной зонипорида (1,12 мг/кг) и максимальной эффективной на модели изопротереноловой гипертрофии миокарда у крыс (5 мг/кг) дозах соответственно. Регистрацию показателей проводили до введения вещества и последующие 60 и 120 минут.

Для амфедазола исследования проводили на 40 крысах-самцах массой 180-210 г.

Животные были распределены на 4 группы: 1 и 3 группы - «контрольные» - животным внутрибрюшинно вводили изотонический раствор натрия хлорида 0,1мл/10г веса, 2 и 4 группы - «опытные» - вводили в течение 30 дней соединение внутрибрюшинно в диапазоне эффективных доз (табл. 6.1) из расчета ЛД<sub>50</sub>: 0,17 (1/100 ЛД<sub>50</sub>) и 0,85 (1/20 ЛД<sub>50</sub>) мг/кг соответственно.

Изучение поведенческих реакций проводили в тесте «открытое поле». Регистрировали следующие параметры: горизонтальную и вертикальную двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение, уровень эмоционального реагирования животных.

Двигательную координацию и мышечно-расслабляющее действие изучали в тестах «Ротарод» (длительность удержания животного на металлической перекладине диаметром 3 см, в течение 30 секунд, со скоростью вращения 10 оборотов в минуту) и «удержания на сетке» (количество лапок, участвующих в удержании животного в баллах (1 лапка – 1 балл), в течение 20 секунд).

Регистрация скорости развития болевой реакции осуществлялась при наложении зажима на основании хвоста (оценивали в секундах).

Настороженность животных определяли с помощью стандартного звукового раздражителя (в баллах: 0 – отсутствие реакции; 1 – замирание; 2 – вздрагивание; 3 – прыжок).

Визуально в баллах оценивали наличие/отсутствие: судорог (0 – отсутствие, 1 – двигательное возбуждение, бег, 2 – клонические, 3 – тонические), тремора (0 – отсутствие, 1 – локальный, мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 – локальный, среднеамплитудный тремор, 3 – генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела), изменения положения тела (1 - нормальное положение, 2-5 – последовательно возрастающее угнетение рефлексов положения: 2 – боковое; 3 – на спине, сгибается; 4 – полубок, 3 – лапы вверху, одна на полу; 5 – на спине, лапы сложены), характера походки (изменение, сниженный тонус передних лапок).

Слуховой и роговичный рефлекс проверяли по реакции отдергивания головы при раздражении слухового прохода и роговицы соответственно. Ипсилатеральный сгибательный рефлекс оценивали путём сдавливания задней лапы зажимом с учетом

времени возникновения и силы отдергивания.

Спонтанную двигательную активность определяли на одноканальном актометре фирмы "Ugo Basile" (Италия) в течение 5 минут (суммарное количество передвижения животных в камере).

Определяли функциональное состояние вегетативной нервной системы: размер зрачка, птоз верхнего века, саливация, пилоэрекция, цвет кожи. Подсчитывали число дыхательных движений у бодрствующих животных в течение 1 мин. Термометрию проводили электронным термометром («OMRON», Германия), в прямой кишке на глубине 15 мм.

**Острую токсичность** определяли в соответствии методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Арзамасцев, 2012]. Для соединений РУ-1355, амфедазола и РУ-539 исследования проводили на 150 белых нелинейных мышах—самцах массой 20-22 грамма (ООО «Питомник РАМТН», ветеринарное свидетельство 202 № 0128531 от 19.12.2012) при внутрибрюшинном введении. Дополнительно для амфедазола LD<sub>50</sub> определяли на 40 белых нелинейных крысах-самцах при внутривенном (через хвостовую вену) введении. Изучаемые вещества вводили однократно. Оценка общего состояния и поведения животных проводилась по: характеру двигательной активности, координации движений, наличию судорог и их типу, наличию тремора, рефлекторных реакций на внешние раздражители - звуковые (постукивание по клетке), тактильные (прикосновение к коже), оценивали состояние шерстяного покрова (шерсть взъерошенная или гладкая, блестящая или тусклая). Через 24 часа подсчитывался процент павших и выживших животных. Величину токсикологического показателя - LD<sub>50</sub> - рассчитывали по методу Личфилда-Вилкоксона [Беленький, 1963].

**Кардиальные побочные эффекты** соединений в эффективных концентрациях регистрировали на протяжении всех фармакодинамических исследований при сравнении: наличия нарушений ритма сердца, влияния на сократимость миокарда у животных, получавших или не получавших соединения (см. главы 3-5), а также при проведении общетоксикологических исследований.

Кроме того, для изучения кардиальной токсичности амфедазола моделировали **острую ишемию** миокарда путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии



в верхней ее трети на 30 минут, и **инфаркт миокарда, который** формировали окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии в верхней ее трети в течение 90 минут с последующей 48-ми часовой реперфузией. Исследования проводились на 40 интактных кошках, обоего пола, весом 2,5-4,5 кг, наркотизированных этаминалом натрия (50 мг/кг, внутривенно) в условиях искусственной вентиляции легких, торакотомии и перикардотомии.

Проводили расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $M$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ). (пакет Office XP, Microsoft, США).

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Проверку выборки на нормальность выполняли с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух зависимых выборок проводили с помощью непараметрического парного теста Вилкоксона, трех и более зависимых выборок - непараметрическим методом Фридмана с посттестом Данна. Сравнение двух независимых выборок выполняли с помощью непараметрического парного теста - U-критерий Манна-Уитни, трех и более независимых выборок - непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с посттестом Данна. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

## **6.2. ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1355 И АМФЕДАЗОЛА**

**Соединение РУ-1355** при однократном внутривенном введении в эквивалентной эффективной дозе (1,12 мг/кг) и максимальной эффективной на модели изопротереноловой гипертрофии миокарда у крыс (5 мг/кг) дозах не влияло на эмоциональное поведение животных (проявления признаков агрессивности, пугливости, вокализации). На протяжении всего исследования нервно-мышечная возбудимость мышей оставалась в пределах нормы. Парезов, тремора, судорог и синдрома Штрауба не наблюдали. Уровень роговичного, слухового и ипсилатерального сгибательного рефлексов соответствовал показателям контрольных животных. В период исследования не наблюдали

изменений реакции зрачка на свет, ректальной температуры, частоты дыхательных движений, болевой чувствительности, цвета кожи; появления птоза, экзофтальма.

При введении мышам соединения РУ-1355 внутрибрюшинно в дозах 1 и 5 мг/кг значимых изменений позы животных, тонуса конечностей, нарушений двигательной активности и мышечной координации в течение всего исследования не наблюдали (табл. 6.2). Так, снижение групповой спонтанной активности в актометре выявлено как в контрольных так и опытных группах животных. При введении исследуемого вещества в дозе 5 мг/кг в тесте «Ротарод» показано, что к 60 и 120 секунде происходило снижение двигательной координации в среднем на 18% по отношению к контрольной группе с физиологическим раствором ( $p>0,05$ ). При изучении поведенческих реакций у мышей, получавших соединение РУ-1355 в дозах 1 и 5 мг/кг, и контрольных животных наблюдали одинаковые тенденции в снижении ориентировочно-исследовательского поведения и уровня эмоционального реагирования к концу эксперимента (табл. 6.3).

Таблица 6.2

**Влияние соединения РУ-1355 на двигательную координацию и мышечный тонус при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозах 1 и 5 мг/кг ( $M\pm m$ )**

№	Группы	Время наблюдения (минуты)	Актометр		«Ротарод» (секунды)	Удержание на сетке (баллы)
			суммарное количество замыканий	%		
1.	Контроль 1 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	Исход	186	100	30,00±0,00	4,00±0,00
		60	81	43,65	30,00±0,00	3,83±0,18
		120	103	55,38	30,00±0,00	4,00±0,00
2.	Соединение РУ-1355, 1 мг/кг	Исход	240	100	30,00±0,00	4,00±0,00
		60	123	51,30	30,00±0,00	3,67±0,37
		120	14	11,02	27,50±1,17	3,83±0,18
3.	Контроль 2 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	Исход	90	100	30,00±0,00	3,83±0,18
		60	59	65,56	30,00±0,00	3,83±0,18
		120	45	50,00	30,00±0,00	4,00±0,00
4.	Соединение РУ-1355, 5 мг/кг	Исход	91	100	30,00±0,00	4,00±0,00
		60	36	39,56	24,33±2,95	4,00±0,00
		120	75	82,41	24,50±4,50	3,83±0,18

Примечания: статистически достоверных различий не выявлено ( $p>0,05$ ) с исходом своей группы (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна), контролем (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна).

Таблица 6.3

**Влияние соединения РУ-1355 на поведенческие реакции в тесте "Открытое поле" при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозах 1 и 5 мг/кг ( $M \pm m$ )**

№	Группы	Время измерения (минуты)	Горизонтальная активность (количество пересеченных квадратов)	Вертикальная активность (количество вертикальных стоек)	Поисковая активность (количество заглядываний в норку)	Груминг (частота возобновления действий)	Выходы в центр (количество)	Болюсы (количество)	Уриная (количество совершенных актов)
1.	Контроль 1 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	Исход	39,50±4,26	5,00±2,06	4,67±1,22	0,83±0,52	0,67±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00
		60	29,83±3,12	7,83±1,68	4,83±1,37	1,67±0,37	1,50±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00
		120	17,50±6,36*	5,17±2,03	1,33±0,46*	1,17±0,34	1,17±0,44	0,00±0,00	0,00±0,00
2.	Соединение РУ-1355, 1 мг/кг	Исход	43,83±9,65	10,67±3,57	7,17±2,34	1,00±0,28	0,83±0,34	0,00±0,00	0,17±0,18
		60	23,83±9,67	7,83±4,11	3,17±0,66	1,00±0,40	1,83±1,28	0,00±0,00	0,00±0,00
		120	5,83±1,50*	0,67±0,54*	1,17±0,66*	0,83±0,44	0,00±0,00 <sup>#</sup>	0,00±0,00	0,00±0,00
3.	Контроль 2 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	Исход	17,00±3,26	3,83±1,18	4,17±1,15	1,00±0,57	0,50±0,24	1,00±0,28	0,33±0,23
		60	20,33±4,95	1,33±0,73	3,00±1,33	1,67±0,54	1,50±0,73	0,33±0,23	0,50±0,25
		120	10,17±3,24	1,50±1,12	1,67±1,54	1,33±0,67	1,50±0,73	0,67±0,37	0,83±0,18
4.	Соединение РУ-1355, 5 мг/кг	Исход	22,50±3,45	6,66±0,96	5,83±0,72	1,33±0,23	1,50±0,55	0,00±0,00	0,00±0,00
		60	17,66±10,43	1,83±2,01*	1,33±0,96*	1,83±1,04	0,50±0,55	0,17±0,18	0,00±0,00
		120	4,66±1,93*	0,17±0,18*	0,17±0,18*	0,50±0,55	0,17±0,18*	0,00±0,00	0,00±0,00

Различия статистически значимы по сравнению с: \* - исходом своей группы (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ), <sup>#</sup>

- контролем патологии (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

Таблица 6.4

**Влияние амфедазола на поведенческие реакции в тесте "Открытое поле" после внутрибрюшинного введения в течение 30 дней крысам в дозах 0,17 и 0,85 мг/кг (M±m)**

№	Группы	Количество животных	Горизонтальная активность (количество пересеченных квадратов)	Вертикальная активность (количество вертикальных стоек)	Поисковая активность (количество заглядываний в норку)	Грумминг (частота возобновления действий)	Болюсы (количество)	Уринация (количество совершенных актов)
1.	Контроль 1 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	10	37,5±4,82	7,1±1,56	4,2±1,45	2,5±0,85	3,7±1,14	0,5±0,2
2.	Амфедазол, 0,17 мг/кг	10	38,6±7,01	6,1±1,21	3,7±1,55	1,6±0,45	4,5±1,09	0,4±0,1
3.	Контроль 2 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	10	31,7±5,82	6,3±2,19	7,1±2,4	1,3±0,38	3,1±0,83	0,5±0,2
4.	Амфедазол, 0,85 мг/кг	10	28,8±4,6	4,6±1,18	5,2±1,17	2,1±0,61	4,3±0,68	0,5±0,2

Примечания: статистически достоверных различий ( $p > 0,05$ ) с контролем не выявлено (парный тест - U-критерий Манна–Уитни).

**Амфедазол** после 30-тидневного внутрибрюшинного введения в эффективных на различных моделях дозах 0,17 (1/100 ЛД<sub>50</sub>) и 0,85 (1/20 ЛД<sub>50</sub>) мг/кг не влияло на эмоциональное поведение крыс (проявления признаков агрессивности, пугливости, вокализации). На протяжении всего исследования нервно-мышечная возбудимость животных оставалась в пределах нормы. Парезов, тремора, судорог не наблюдали. Роговичный, слуховой и ипсилатеральный сгибательный рефлекс соответствовали показателям контрольных животных. Реакция зрачка на свет сохранялась. Ректальная температура, частота дыхательных движений, цвет кожи были без изменений. Появление птоза, экзофтальма; изменение болевой чувствительности не выявлено. Нарушений тонуса конечностей, двигательной активности и мышечной координации в течение всего исследования не наблюдали.

При изучении поведенческих реакций у мышей, получавших амфедазол в дозах 0,17 и 0,85 мг/кг, изменений со стороны ориентировочно-исследовательского поведения и уровня эмоционального реагирования по сравнению с показателями контрольных животных не выявлено (табл. 6.4).

Таким образом было показано, что в эффективных дозах соединение РУ-1355 (в дозах 1 и 5 мг/кг) и амфедазол (0,17 и 0,85 мг/кг) не влияли на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывали изменений со стороны вегетативной нервной системы.

### **6.3. КАРДИОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ РУ-1355 и АМФЕДАЗОЛА**

#### **6.3.1. Изучение кардиотоксических свойств соединения РУ-1355**

Наличие кардиодепрессивного и аритмогенного действия соединения РУ-1355 определяли по результатам исследований в главах 2-3.

Так при длительной ишемии/реперфузии (глава 2.4.6.) вещество снижало тяжесть нарушений ритма, при этом случаев аритмогенеза не зафиксировано.

При изучении влияния соединения РУ-1355 на параметры ЭКГ (глава 3.2.4.)

наркотизированных крыс в эффективной дозе, полученной при кратковременной ишемии (1,25 мг/кг), не выявлено значимых изменений (табл. 3.4). В дозе, превышающей эффективную (в суммарной дозе 8,75 мг/кг), наблюдалось увеличение продолжительности зубца Р, интервала PQ, комплекса QRS и, соответственно, снижение ЧСС ( $p < 0,05$ ). Подобные свойства ингибиторов NHE описаны в литературе [Hashimoto, 2003] и связывают их с лечебным действием.

При изучении фармакологических свойств соединения РУ-1355 при курсовом введении (в дозах 1,25 и 5,0 мг/кг/сутки, 31 день) в условиях изопротереноловой гипертрофии миокарда при проведении кардиодинамических нагрузочных тестов было показано улучшение сократительной активности сердца и отсутствие кардиодепрессивного эффекта (глава 3.3.1.).

### **6.3.2. Оценка кардиотоксических свойств амфедазола**

Предполагаемый механизм антиаритмического действия амфедазола связан со способностью увеличивать рефрактерность, блокировать калиевые каналы и удлинять потенциал действия кардиомиоцитов и клеток проводящей системы сердца (глава 4.). Поэтому, при электрокардиографическом исследовании сердца у всех животных, получавших внутривенно амфедазол в течение 30 дней, показана тенденция к угнетению функции синоатриального узла (удлинение интервала RR), увеличению рефрактерности миокарда (удлинение интервала QT<sub>c</sub>), замедлению атриовентрикулярной проводимости (удлинение интервала PQ). Динамика снижения частоты сердечных сокращений представлена в табл. 6.5. В дозе 0,85 мг/кг данные изменения были статистически достоверные. Этот эффект можно считать закономерным и ожидаемым, т.к. он связан со специфической активностью исследуемого соединения.

Известно, что **кардиодепрессивное действие** антиаритмических средств может приводить к снижению сократимости сердца, уменьшению наполнения левого желудочка и, соответственно, к уменьшению насосной функции сердца. В определенных пределах это может быть благоприятным фактором, так как при уменьшается нагрузка на миокард, и, следовательно, потребление им кислорода. Однако чрезмерная гипотензия одновременно может ухудшать кровоснабжение сердца в связи с уменьшением перфузионного давления в

коронарных артериях. При снижении сократимости миокарда возрастает конечно-диастолическое давление, что способствует механическому сдавлению коронарных сосудов и может ограничить кровоток в субэндокардиальных областях сердца и, следовательно, увеличивает потребление сердцем кислорода. Развиваются процессы электрофизиологического, кардиодинамического и морфологического ремоделирования.

Таблица 6.5

**Влияние амфедазола на ЧСС после внутрибрюшинного введения в течение 30 дней крысам в дозах 0,17 и 0,85 мг/кг ( $M \pm m$ )**

№	Группы	Количество животных	ЧСС, мин <sup>-1</sup>
1.	Контроль 1 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	10	429,5±9,7
2.	Амфедазол, 0,17 мг/кг	10	407,7±14,8
3.	Контроль 2 (физ. раствор 0,1 мл/10 г веса)	10	384,0±15,6
4.	Амфедазол, 0,85 мг/кг	10	321,28±13,2*

Примечания: различия, статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) к: \* - группе «контроль» (парный тест - U-критерий Манна–Уитни).

При однократном внутривенном введении амфедазола в средней эффективной (табл. 6.1) дозе 0,6 мг/кг у интактных животных снижение показателей кардио- и гемодинамики не наблюдалось, что статистически значимо по сравнению с интактными животными, получавшими амиодарон (табл. 6.6). В условиях 30-ти минутной ишемии показатели сократимости миокарда  $+dp/dt$ ,  $-dp/dt$  снизились на 15,16 и 12,6%. ЛЖД, ЧСС и АД не изменились. У животных с инфарктом миокарда наблюдали снижение ЛЖД, ЧСС и АД ( $p > 0,05$ ), сохранились тенденции изменений  $+dp/dt$ ,  $-dp/dt$ .

Амиодарон при однократном внутривенном введении в средней эффективной дозе 5 мг/кг у интактных животных вызвал снижение показателей сократимости более чем на 25% ( $p < 0,05$  по отношению к исходному) (табл. 6.6). Подобные изменения сохранялись у животных в экспериментальных группах с 30-ти минутной ишемией и инфарктом миокарда.

По показателю АД<sub>ср</sub> у животных с ишемией наблюдали статистически значимые различия между группами, получавшими амфедазол и амиодарон.

У 66,7% животных с 30 минутной ишемией развивались аритмии. амфедазол и амиодарон купировали возникшие нарушения ритма в 100%. Случаев **аритмогенеза** не выявлено.

Таблица 6.6

**Влияние амфедазола и амиодарона при однократном внутривенном введении в средней эффективной дозе на изменение показателей кардио- и гемодинамики интактных и ишемизированных наркотизированных кошек ( $\Delta$  % по отношению к исходным данным) ( $M \pm m$ )**

№ №	Показатель	Изменение кардио- и гемодинамики при однократном введении кошкам					
		Амфедазола (0,6 мг/кг)			Амиодарона (5 мг/кг)		
		У интактных	С ишемией	С инфарктом	У интактных	С ишемией	С инфарктом
	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	-3,18 $\pm$ 1,47 <sup>#</sup>	-5,45 $\pm$ 5,63	-16,72 $\pm$ 10,17	-26,50 $\pm$ 7,70*	-16,75 $\pm$ 4,25*	-25,14 $\pm$ 7,84*
	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3,70 $\pm$ 2,44 <sup>#</sup>	-15,16 $\pm$ 4,54	-13,27 $\pm$ 10,34	-26,00 $\pm$ 6,00*	-25,00 $\pm$ 5,00*	-23,54 $\pm$ 5,0*
	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	-2,08 $\pm$ 2,08 <sup>#</sup>	-12,60 $\pm$ 4,10	-14,69 $\pm$ 13,05	-27,50 $\pm$ 8,50	-20,80 $\pm$ 2,70*	-35,21 $\pm$ 9,17*
	АД среднее, мм рт. ст.	-2,30 $\pm$ 2,30 <sup>#</sup>	0,33 $\pm$ 1,10 <sup>#</sup>	-8,02 $\pm$ 7,27	-10,10 $\pm$ 2,40*	-9,10 $\pm$ 2,00	-9,35 $\pm$ 3,61*
	ЧСС, уд/мин	-5,20 $\pm$ 2,89	-4,96 $\pm$ 2,47	-8,72 $\pm$ 5,43	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 5,00	-1,67 $\pm$ 1,67

Различия статистически значимы по сравнению с: \* - исходом своей группы (непараметрический метод Вилкоксона,  $p < 0,05$ ), <sup>#</sup> - амиодароном (парный тест - U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).



Таким образом, амфедазол снижает частоту сердечных сокращений при длительном введении. В отличие от амиодарона в средней эффективной дозе не влияет на показатели сократимости у интактных животных; в 1,5-2 раза менее выражено, чем препарат сравнения влияет на них в условиях коронарогенного повреждения миокарда у кошек.

### **6.3.3. Кардиотоксические эффекты соединения РУ-539**

При изучении влияния соединений на сократительную активность и функциональные резервы миокарда животных без экспериментальной патологии в условиях проведения нагрузок был показан положительный инотропный эффект во всех экспериментальных группах, статистически значимо не отличающийся друг от друга. Соединение РУ-539 в дозе, равной двум эффективным, увеличивало ЛЖД и МИФС во всех тестах подобно контрольной группе (табл. 6.7). Реализация кардиодинамического ответа определялась в большей степени за счет сократимости и в меньшей степени за счет увеличения ЧСС. Поэтому наблюдалось более выраженное увеличение АД<sub>ср</sub>.

## **6.4. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ**

По результатам исследований острой токсичности веществ РУ-1355, амфедазола и РУ-539 установлены уровни летальных доз для самцов и характерные однотипные признаки интоксикации. При этом выраженность и длительность токсических эффектов зависела от дозы соединения.

Развитие у животных признаков интоксикации веществом наступает практически сразу после окончания внутривенного (амфедазол, крысы) или через 10-15 минут внутрибрюшинного (вещества РУ-1355, амфедазол и РУ-539, мыши) введения доз, превышающих терапевтические.

В субтоксических дозах отмечали угнетение поведенческой активности, с седацией, нарушением ритма дыхания, снижением болевой и тактильной чувствительности. Реабилитация поведенческой и рефлекторной активности у этих животных отмечалась в течение первых суток наблюдений. Гибели животных обнаружено не было.

В высоких дозах характерными признаками отравления данными соединениями являлись: ограничение подвижности, снижение болевой и тактильной чувствительности, частое поверхностное дыхание. Непосредственной гибели животных предшествовали

явления глубокой седации, угнетения дыхания, боковое положение с редкими клоническими судорогами. Величины  $LD_{50}$  представлены в таблице 6.8.

У крыс, оставшихся в живых, восстановление дыхательной, поведенческой, пищевой и рефлекторной активностей наблюдались на вторые сутки после введения вещества. При последующих наблюдениях за животными в течение двух недель отдаленной гибели не отмечалось.

Таблица 6.7

**Влияние соединения РУ-539 при однократном внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в условиях проведения функциональных нагрузок у интактных животных ( $M \pm m$ )**

№	Показатель	Максимальный ответ на нагрузку, Δ %		
		<i>преднагрузка</i> - нагрузка объемом	<i>на адрено- реактивность</i>	<i>постнагрузка</i> - максимальная изометрическая нагрузка
<i>Контроль</i>				
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	25,87±7,13 <sup>\$</sup>	28,72±7,75 <sup>\$</sup>	91,88±13,63 <sup>\$</sup>
2	ЧСС, уд/мин	5,57±4,01	10,27±3,41 <sup>\$</sup>	5,56±4,12
3	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	22,46±9,99 <sup>\$</sup>	33,32±10,80 <sup>\$</sup>	74,97±8,13 <sup>\$</sup>
4	АД <sub>ср</sub> , мм рт. ст.	22,06±3,22 <sup>\$</sup>	27,40±6,99 <sup>\$</sup>	-
<i>Соединение РУ-539 (0,84 мг/кг)</i>				
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	27,69±10,93 <sup>\$</sup>	28,23±8,59 <sup>\$</sup>	85,62±18,82 <sup>\$</sup>
2	ЧСС, уд/мин	-0,22±4,50	2,86±11,85	9,56±5,44
3	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	35,92±6,64 <sup>\$</sup>	30,98±10,06 <sup>\$</sup>	81,22±8,28 <sup>\$</sup>
4	АД <sub>ср</sub> , мм рт. ст.	28,82±7,10 <sup>\$</sup>	41,15±12,15 <sup>\$</sup>	-

Различия статистически значимы по сравнению с:  $^{\$}$  - исходом своей группы (непараметрический метод Вилкоксона,  $p < 0,05$ ). Статистически значимых различий по отношению к контролю не выявлено (парный тест - U-критерий Манна-Уитни,  $p > 0,05$ ).

Таблица 6.8

**Данные острой токсичности наиболее активных кардиопротекторных веществ, производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов ( $LD_{50}$ )**

№	Вещество	Животные	Путь введения	Доза $LD_{50}$ , мг/кг
1.	Соединение РУ-1355	Мыши-самцы	внутрибрюшинно	342,7
2.	Амфедазол	Крысы-самцы	внутривенно	17,0
		Мыши-самцы	внутрибрюшинно	60,0
3.	Соединение РУ-539	Мыши-самцы	внутрибрюшинно	118,0

## 6.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, соединения РУ-1355 и амфедазол в эффективных дозах не влияли на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывали изменений со стороны вегетативной нервной системы. Не оказывали аритмогенного действия. Соединения РУ-1355, амфедазол и РУ-539 не ухудшали сократимость миокарда интактных животных. По величине  $LD_{50}$  в соответствии с классификацией токсичности веществ по Березовской [2003, 2010] исследуемые производные бензимидазола (соединения РУ-1355, амфедазол, РУ-539) можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс).

## 7. ОБСУЖДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются значимой медико-социальной проблемой, поскольку занимают первое место в структуре заболеваемости и смертности во всем мире [Абдюкова, 2010; Мареев, 2010; Шилов, 2011; Баланова, 2013; Шальнова, 2013; Шляхто, 2013; Tamargo, 2009; Trochu, 2009; Coons, 2011; Janssens, 2012; Liu, 2013]. Наибольшую угрозу жизни представляют ишемическая болезнь сердца (ИБС), сопровождающаяся риском внезапной коронарной смерти и инфаркта миокарда, артериальная гипертензия, сопряженная с высоким риском острого нарушения мозгового кровообращения [Колбин, 2010; Шаваров, 2011]. В структуре общей смертности населения Российской Федерации ишемическая болезнь сердца занимает 25,7%, инсульт - 21,4% [Оганов, 2012; Скворцова, 2013; Бойцов, 2014]. Доля возникновения внезапной сердечной смерти в структуре общей смертности составляет около 13%, доля ее в структуре смертности от ИБС достигает 50% [Шогенов, 2011; Моисеев2, 2010-2012; Bontempo, 2011; Benito, 2012; Kappenberger, 2013; Thihalolipavan, 2014].

Ближайшая цель лечения СС заболеваний заключается в непосредственном купировании возникшего синдрома (острый коронарный синдром, пароксизм мерцательной аритмии, гипертонический криз и др.). Глобальной задачей является улучшение прогноза заболевания, предупреждение развития осложнений, увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества [Шляхто, 2005; Симоненко, 2011; Моисеев2, 2012а,б], то есть речь идет о кардиопротекции.

Основные подходы кардиопротекции направлены на сохранение или повышение жизнеспособности миокарда: угнетение атеросклеротических процессов в коронарных сосудах и сохранение их проходимости; повышение толерантности к гипоксии; замедление ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования; результатом чего является регрессия гипертрофии сердца, нормализация геометрии камер сердца и восстановление электрофизиологической гомогенности миокарда [Арутюнов, 2002; Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010].

Таким образом, основными мишенями кардиопротекции являются трансмембранные ионные токи, мембранных ферменты и обменники ионов, метаболизм миокарда и другие факторы, нарушение со стороны которых приводят к ремоделированию структур сердца. А

при поиске и создании новых кардиопротекторных веществ, необходимо оценивать целый комплекс релевантных противоишемическому, антифибрилляторному, инотропному эффекту механизмов действия.

Современные подходы к созданию новых лекарственных препаратов связаны с активно развивающейся концепцией "привилегированных подструктур", позволяющей исследователям более эффективно искать перспективные соединения для последующего изучения в качестве потенциальных лекарственных средств [Horton, 2003; DeSimone, 2004; Kamal, 2006; Han, 2011; Kim, 2014; Szabo, 2014]. Эти структуры представляют класс молекул, способных к взаимодействию с высоким сродством со многими биологическими мишенями. Основными направлениями использования привилегированных подструктур является генерация на их основе «комбинаторных библиотек», их последующий тотальный скрининг на наличие активности в отношении различных биомишеней, выявление активных структур, конструирование скаффолдов. Сама такая подструктура выступает ядром (ядром, основой) биологически активного вещества и составляет главную часть ее структуры. При ее модификации различными заместителями возможно построить скаффолды соединений с высоким сродством к тому или иному рецептору.

**Бензимидазол является "привилегированной подструктурой" с широким потенциалом биологической активности.** Класс конденсированных и неконденсированных бензимидазолов является перспективным для создания на его основе новых препаратов [Bansal, 2012; Shah2, 2013], о чем свидетельствует широкий спектр проявляемой биологической активности [Анисимова 1999-2012; Галенко-Ярошевский, 2007, 2009а,б, 2013, 2015; Спасов, 1984-2014; Bansal, 2012; Narasimhan, 2012; Barot, 2013; Jain, 2013; Shah2, 2013; Gaba, 2014; Keri, 2014], **в том числе высокий процент активных кардиотропных соединений** [Спасов, 1984-2013; Чичканов, 1997; Каверина, 2004; Турилова, 2010; Серединин, 2013; Perrone, 2005; Estrada-Soto, 2006; Zhang, 2007; Rao, 2009; Vyas, 2010; Navarrete-Vazquez, 2010]. Кроме того, производные бензимидазола являются **структурными биоизостерами природных нуклеотидов**, что позволяет им легко взаимодействовать с биополимерами в живой системе [Зефирова, 2002; Narasimhan, 2012; Keri, 2014].

Данные, представленные в главе 1, свидетельствуют о большом кардиотропном потенциале производных БИ. Среди конденсированных и неконденсированных бензимидазолов найдены кардиопротекторные соединения, относящиеся к ингибиторам натрий-водородного обменника (NHE) [Zhang, 2007; Международная база Thomson Reuters Integriti, 2011]; проявляющие признаки высокого сродства к ионным каналам [Анисимова, 2009; Галенко-Ярошевский, 2009, 2015; Поротиков, 2008], известны антиаритмические (афобазол и ритмидазол) [Кириллов, 1996; Шабашева, 1997; Спасов, 1999; Петров, 2003; Цорин, 2009; Крыжановский, 2012, 2013; Середенин, 2013] и инотропные (пимобендан и адибендан) [Gordon, 2006; Endoh, 2008; Rao, 2009; Boswood, 2010] препараты. Найдены противоишемические вещества, способные стабилизировать работу сердца в условиях гипоксии и снижать агрегацию тромбоцитов [Спасов, 1984; Панченко, 1990; Чернов, 1990].

Кроме того, в ВолгГМУ накоплен значительный объем экспериментальных данных о влиянии гетероциклических азотсодержащих соединений на усвоение навязанного ритма изолированными предсердиями крыс [Спасов, 1984; Анисимова, 2002-2012], активности в отношении ФДЭ цАМФ [Ларионов, 1988].

Важным направлением современной фармакологии и медицинской химии является оптимизация подходов к поиску новых высокоактивных соединений. Исследования *in silico* позволяют в короткие сроки оценить перспективность каждого химического класса как возможного химического ядра для направленного поиска активных веществ, провести сравнительный анализ спектров прогнозных и экспериментальных оценок фармакологической активности данных веществ [Зефирова, 2000]. Подобный подход позволяет выбрать вещества, которые максимально соответствуют, как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам, "образу" активного соединения, с учетом релевантных механизмов действия.

**Таким образом, на основании знаний о высокой эффективности кардиопротекторных препаратов для улучшения прогноза СС заболеваний и предупреждения развития осложнений; современных подходах к созданию мультитаргетных препаратов; литературных данных о большом кардиопротекторной потенциале производных бензимидазолов; учитывая накопленные экспериментальные данные, в том числе базы данных кафедры фармакологии ВолгГМУ, посчитали возможным**

провести направленный поиск перспективных кардиопротекторов, влияющих на ионное (ингибиторов NHE), электрофизиологическое (влияющих на трансмембранные ионные токи и рефрактерность миокарда), гемодинамическое (ингибиторов ФДЭ) и, следовательно, морфологическое ремоделирование с последующим экспериментальным изучением фармакологического потенциала.

В настоящем исследовании на первом этапе был проведен консенсусный прогноз *in silico* перспективности производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов как источников веществ с кардиопротекторной активностью в системах PASS для 19 видов биологической активности, релевантных антиаритмическому, противоишемическому, кардиотоническому действию и с помощью ИТ Микрокосм по сходству к референсным препаратам на основе модифицированного коэффициента Танимото. При объединении результатов прогноза, полученных с помощью этих двух систем, было выявлено, что для ряда в 1393 соединений 71,4% производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов могут проявлять антиаритмическую, 56,4% - кардиотоническую, 35,6% - противоишемическую активности. Соответственно, было показано, что класс производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов является перспективным для проведения экспериментального поиска кардиопротекторов, и выдвинуто предположение о том, что на базе бензимидазола возможно нахождение общего химического скаффолда, который будет одинаково применим для видов активностей, характеризующих кардиопротекторное действие.

Для проверки данного предположения на втором этапе в исследованиях *in silico* и *in vitro* был проведен направленный поиск среди производных бензимидазола соединений с антиаритмической, противоишемической и инотропной активностями.

Для проведения данного исследования специалистами медицинской химии НИИ ФОХ РГУ под руководством В.А.Анисимовой были синтезированы 540 соединений 12 классов производных бензимидазола ( $N^1$ -бензимидазолы; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазолы;  $N^9$ -имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^9$ -2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^1$ -имидазо-[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы;  $N^4$ -пиразоло[1,5-*a*]-бензимидазолы; пиролло[1,2-*a*]-бензимидазолы; пиримидо-

[1,2-*a*]бензимидазолы, тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолы; 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы).

При проведении **поиска соединений, обладающих способностью влиять на возбудимость изолированных предсердий крыс (с антиаритмической активностью)**, проведены ретроспективный анализ активных и неактивных структур, экспериментальная проверка компьютерного прогноза, расширенный комплексный анализ *in silico*, выявлены определенные закономерности влияния типа ядра, различных заместителей и их положения на высокий уровень активности, построены целевые скаффолды.

Снижение частоты внезапной сердечной смерти в настоящее время считают основным критерием эффективности антиаритмической терапии [Моисеев2, 2012а,б; Singh1, 2007, Singh2, 2009; Nanda, 2010]. В мультицентровых исследованиях 90-х годов 20 века CAST, CASCADE, ESVEM, EMIAT, CAMIAT и др. у больных, перенесших инфаркт миокарда, наблюдалось увеличение смертности при приеме антиаритмиков 1 класса, и высокая антиаритмическая и кардиопротекторная активности препарата III класса со сложным механизмом действия - амиодарон [Мазур, 1994; Мареев, 1996; Singh1, 1995; Skanes, 1996; Hohnloser, 1997; Meinerzt, 1997; Das, 2010]. Одним из предположений низкой эффективности "чистых" антиаритмиков в профилактике неблагоприятных исходов является тот факт, что они не влияют на обратное ремоделирование сердца [Моисеев, 2012]. Поэтому целесообразно вести поиск кардиопротекторных препаратов с антифибрилляторными свойствами среди антиаритмических соединений III класса.

Электрическое ремоделирование при фибрилляциях подразумевает вызванное тахикардией укорочение эффективного рефрактерного периода и удлинение времени проведения. Fontana в 1767 г. описал явление рефрактерности в миокарде, а Lewis и Drury в 1926 г. предположили, что существенным антиаритмическим и антифибрилляторным механизмом является увеличение эффективного рефрактерного периода [Кузьмин, 2010].

В данном исследовании были изучены соединения 10 классов производных бензимидазола (N<sup>1</sup>-бензимидазолы; 2,3-дигидро-N<sup>1</sup>-бензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо-[1,2-*a*]-бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолы; пиролло-[1,2-*a*]бензимидазолы; пиримидо-[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-



имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы).

При проведении ретроспективного анализа влияния типа ядра на рефрактерность миокарда (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) предсердий крыс 301 ранее изученных соединений [Спасов, 1984] были выявлены классы, представляющие наибольший интерес для дальнейшего изучения (производные N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, N<sup>4</sup>-пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола, N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола ).

С использованием данных по структуре и активности испытанных оригинальных производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов был проведен виртуальный скрининг в ИТ «Микрокосм» неиспытанных соединений перспективных классов и классов, эффективность которых требовала уточнения [Васильев, 2009] и выполнен блок собственных исследований - экспериментальный поиск *in vitro* соединений, влияющих на рефрактерность (способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода) изолированных предсердий крыс среди 167 неиспытанных соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов, в отношении которых получен положительный прогноз высокой антиаритмической активности *in silico*, а так же вновь синтезированных соединений.

Путем обобщения результатов *in silico* ретроспективного и расширенного подструктурного анализа влияния типа ядра на «очень высокий» и «высокий» уровни активности, а также результатов анализа по средним и супремальным оценкам, были выявлены некоторые важные закономерности. В первую очередь, было показано, что перспективным ядром для создания целевого скаффолда соединений с антиаритмической активностью, является структура бензимидазола, модифицированная путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей. Среди различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов производные N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются наиболее перспективными для разработки структурно новых антиаритмических соединений с антифибрилляторной активностью, поскольку для них характерно проявление «очень высокой» способности влиять на рефрактерность изолированных предсердий. Они могут быть отнесены к принципиально новому классу

( $МЭК < 3,74 \cdot 10^{-5} M$ ) антиаритмических соединений, поскольку по результатам кластеризации по активности в этот класс не попадают такие известные антиаритмические препараты, изученные на этой модели, как амиодарон, этмозин (морицизин), хинидина сульфат. Обращает на себя внимание тот факт, что для ядра N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола характерно проявление преимущественно «очень высокой» активности. Тогда как базовая структура N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности с высокой лабильностью химической структуры, поскольку этот признак устойчиво воспроизводится как для уровня активности «очень высокий», так и для уровня «высокий».

Производные N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола являются перспективными как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на модификацию (заместители и их положение). В результате расширенного подструктурного анализа влияния заместителей на «очень высокий» уровень антиаритмической активности удалось выявить заместители, значимо детерминирующие в рядах N<sup>1</sup>- и N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов влияние на рефрактерность изолированных предсердий. Общими для них являются в положении C<sup>2</sup> - фенил - (Ind=+5 и +4, соответственно) и в положении N<sup>1</sup> или N<sup>9</sup>, соответственно, - диэтиламиноэтил - (Ind=+5 у обоих классов).

Поскольку ядро N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола является высокодостоверным признаком антиаритмической активности с значительной лабильностью химической структуры (поскольку этот признак устойчиво воспроизводится как для уровня «очень высокий», так и «высокий») на его основе построен целевой скаффолд соединений с выраженной способностью увеличивать рефрактерность изолированных предсердий. Среди производных N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола было найдено соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) - амфедазол, которое максимально соответствует по вычислительным и экспериментальным оценкам «обобщенному образу» активного антиаритмического соединения. Оно полностью включает целевой скаффолд. амфедазол в исследованиях *in vitro* уменьшает возбудимость изолированных предсердий, что является косвенным показателем удлинения эффективного рефрактерного периода миокарда ( $МЭК = 1,60 \cdot 10^{-5} M$ ). Соединение превосходит амиодарон по величине МЭК в 10

раз, по терапевтическому индексу – в 2,2 раза.

При изучении влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки показано сложное мембранотропное действие. В исследованиях В.И. Поротикова выявлено выраженное дозозависимое блокирующее влияние на выходящие токи калия. Так при введении амфедазола в дозе  $1 \cdot 10^{-6}$  М калиевый ток уменьшился на 39%, а уже в дозе  $5 \cdot 10^{-5}$  М был заблокирован на 60%. В отношении быстрого  $\text{Na}^+$  и медленного  $\text{Ca}^{2+}$  ионных токов дозозависимого блокирующего эффекта не наблюдалось.

Таким образом, амфедазол увеличивает продолжительность рефрактерного периода изолированных предсердий крыс, обладает сложным мембранотропным амиодароноподобным эффектом в исследованиях на трансмембранных ионных токах, что дает возможность предположить у него свойства антиаритмиков III класса, в том числе антиремоделирующее (кардиопротекторное) действие - антифибрилляторную и противоишемическую активность.

При проведении **поиска противоишемических соединений с NHE-ингибирующей активностью** так же выполнены собственные экспериментальные исследования *in vitro* и комплексный анализ зависимости структура-активность *in silico*, найдены определенные закономерности влияния типа ядра, различных заместителей и их положения на высокий уровень активности, построен целевой скаффолд.

Механизм повреждения кардиомиоцитов при возникновении целого ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы связан со снижением pH внутриклеточной среды и развитием «кальциевого парадокса». Эти изменения, нередко являются определяющими для прогноза заболевания. Поэтому, одним из современных подходов кардиопротекции является коррекция нарушений ионного обмена кардиомиоцитов [Петров, 2007; Михин, 2009; Спасов, 2006б, 2008, 2012, 2013г; Симоненко, 2011; Jahangir, 2007; Andreadou, 2008].

В последние годы в качестве возможного физиологического и патофизиологического фактора в механизмах повреждения миокарда, таких как ишемический и реперфузионный стресс, аритмии, нарушения сократительной функции и гибель клетки, выделяют сарколеммный  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник 1 изоформы (NHE-1) [Писаренко, 2004; Slepков, 2007; Fliegel, 2009; Cingolani, 2007, 2011]. Поскольку в исследованиях *in vivo* было показано, что

селективное ингибирование NHE-1 обменника может отсрочить прогрессию повреждений сердца и улучшить восстановление основных функций, многие рассматривают NHE-1 как новую мишень для цитопротекции [Писаренко, 2004, 2005; Avkiran, 2003; Fliegel, 2008].

В настоящее время такие ингибиторы NHE-1 как зонипорид, карипорид (GUARDIAN, Phase2/phase3; EXPEDITION, Phase 3), сабипорид, энипорид (ESCAMI, Phase 2), достигли этапа клинических испытаний при заболеваниях коронарных артерий и атеросклерозе, аритмиях, остром инфаркте миокарда, сердечной недостаточности [Karmazyn, 2013; Madonna, 2013].

При анализе химической структуры было показано, что NHE-1-ингибирующей активностью обладают молекулы, содержащие гуанидиновые группировки [Orlowski, 2011]. Кроме того, производные бензимидазола обладают подобными свойствами [Zhang, 2007]. Поэтому был проведен поиск новых ингибиторов NHE-1 среди соединений данного класса.

В исследованиях *in vitro* на тромбоцитах кролика по методу [Roskopf, 1991; Kusumoto, 2002] проведен поиск веществ с NHE-ингибирующей активностью среди 59 соединений различных классов производных бензимидазола (2-аминобензимидазолы; N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*] бензимидазолы; N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы; N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы) в сравнении с ингибитором NHE зонипоридом. Методом кластерного анализа определены границы классов NHE-ингибирующей активности *in vitro* среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов для каждой из исследуемых доз ( $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$  М) и для IC<sub>50</sub>, рассчитан средний балл активности. 34 соединения по среднему баллу превосходили зонипорид.

При проведении подструктурного анализа влияния типа ядра на «высокий» уровень NHE-ингибирующей активности, а также анализа по средним и супремальным оценкам были выявлены определенные закономерности. Наиболее перспективным как по вкладу в активность базовой структуры, так и по степени реакции на модификацию оказалось ядро 2-аминобензимидазола. В результате подструктурного анализа влияния заместителей был выявлен значимый заместитель в положении N<sup>1</sup>: морфолиноэтильный. Заместители в положении N<sup>3</sup> не рассматривались ввиду их низкой вариабельности.

Построен целевой скаффолд соединений, с высокой NHE-ингибирующей

активностью. По результатам поиска *in vitro* и *in silico* найдено соединение РУ-1355, которое относится к наиболее перспективному классу N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазола, полностью включает целевой скаффолд. Оно активно ингибировало NHE тромбоцитов кролика (IC<sub>50</sub>=5,4\*10<sup>-10</sup>М), по IC<sub>50</sub>превосходило препарат сравнения зонипорид (IC<sub>50</sub>=2,7\*10<sup>-8</sup>М).

Известно, что активация сарколемного NHE-1 кардиомиоцитов является одним из повреждающих факторов в период ишемии и реперфузии [Зверев, 2003; Спасов, 2013г; Masereel, 2003; Malo, 2006; Luo1, 2007; Fliegel, 2009]. В физиологических условиях он не активен. Во время ишемии обменник начинает выводить из саркоплазмы клетки ионы H<sup>+</sup>, накапливающиеся там из-за активизации процесса гликолиза, в обмен на вход ионов Na<sup>+</sup>. Возросший уровень внутриклеточного Na<sup>+</sup> активирует реверсивное движение ионов с помощью NCE-обменника (3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмен) через сарколемму, инициируя вход ионов Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоциты. Во время реперфузии рост уровня кальция продолжается за счет большого градиента вне/внутриклеточных протонов. «Ca<sup>2+</sup>-перегрузка» приводит к ухудшению функции проводящей системы и сократительного миокарда, ремоделированию желудочков, активации апоптоза, гибели клеток.

Поэтому для подтверждения действия *in vivo* был проведен комплексный анализ противоишемических свойств соединения РУ-1355 с учетом определения зоны некроза миокарда и уровня тропонина I в крови.

На модели длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс было показано противоишемическое действие соединения РУ-1355 при однократном внутривенном введении в дозе 1,12 мг/кг (эквимоларной зонипориду). Вещество уменьшало тяжесть ишемического повреждения миокарда, о чем свидетельствует статистически значимое снижение подъема сегмента ST на 32% по отношению к контролю и 43,3% по отношению к ишемии 50 минут. Наблюдалось достоверное сокращение зоны инфаркта в группе животных, получавших соединение РУ-1355, по сравнению с размерами зоны некроза у контрольной группы с ишемией в 1,8 раза и зонипоридом в 1,3 раза. Изучаемое вещество ограничивало рост тропонина I в плазме крови. Его уровень оказался ниже такового контрольных животных в 2,5 раза (p<0,05), и на 19% у крыс, получавших зонипорид.

Таким образом, соединение РУ-1355 (2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенил)-

бензимидазолия хлорид), является ингибитором NHE-1, способно ограничивать ишемические и постреперфузионные повреждения сердца, вероятно, предотвращая избыточное поступление кальция внутрь кардиомиоцитов. Оно максимально соответствует, как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам *in vitro* и *in vivo* «обобщенному образу» активного противоишемического соединения.

В дальнейшем был проведен **поиск инотропных соединений** с кардиопротекторными свойствами **среди ингибиторов ФДЭ**.

Крупномасштабные рандомизированные исследования, выполненные в последние десятилетия, позволили уточнить место различных лекарственных препаратов в медикаментозной терапии больных с ХСН [Беленков, 2008; Сидоренко, 2005; Bangash, 2012; Ezekowitz, 2013; Francis, 2014].

Создание негликозидных инотропных препаратов позволило более выражено повышать сократимость миокарда, чем при использовании гликозидов, не вызывая побочных реакций, свойственных последним [Сидоренко, 2005; Бакшеев, 2007; Беленков, 2008; Моисеев1, 2009; Adawa, 1986; Farah, 1986; Ding, 2005; Perrone, 2005; Endoh, 2006; Hasenfuss, 2011; Francis, 2014]. Однако современные негликозидные инотропные препараты применяют лишь в виде коротких курсов, когда резкое повышение сердечного выброса позволяет добиться увеличения диуреза и выведения пациента из состояния тяжелой декомпенсации [Chatterjee, 2003; Отрохова, 2007; Movsesian, 2009].

В настоящее время ведется поиск препаратов, улучшающих сердечную деятельность с благоприятным профилем безопасности. На этапе доклинических испытаний находится много новых положительных инотропных средств механизмы действия которых, связаны с регуляцией ионного обмена кальция ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза, SERCA, рианодиновые рецепторы), влиянием на сократительные белки, метаболические модуляторы энергии [Гуревич, 2008; Endoh, 2008; Teerlink, 2009a,b; Tamargo, 2011; Garg, 2013; Liu1, 2013; Francis, 2014].

Сохраняется интерес к препаратам, обладающим свойствами ингибиторов ФДЭ и сенситайзеров  $\text{Ca}^{2+}$ , благодаря тому, что у препаратов данной группы нового поколения выявлена кардиопротекторная активность. Предполагаемые защитные механизмы действия от вызываемого ишемией-реперфузией повреждения кардиомиоцитов - способность стабилизировать цитоскелет и сократительные волокна [Rao, 2009; Osadchii, 2007c].

Препараты данной группы имеют высокий терапевтический потенциал для лечения сократительных дисфункций при ХСН и ишемии сердца, т.к. у них высокий энергетический потенциал и меньший риск переизбытка  $\text{Ca}^{2+}$ , а так же поддерживают свою активность в патологических состояниях.

Многие известные ингибиторы ФДЭ-3, производные бензимидазола (адибендан, пимобендан, сульмазол), улучшают инотропную функцию в результате повышения внутриклеточного кальция и усиления чувствительности миофиламентов к кальцию [Гуревич, 2008; Endoh, 2008]. Поэтому было целесообразно провести поиск новых инотропных соединений среди производных бензимидазола - ингибиторов миокардиальной ФДЭ.

Ранее в исследованиях *in vitro* Н.П. Ларионовым было определено влияние 60 соединений различных классов конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на наличие антифосфодиэстеразной активности на гомогенате тканей миокарда кролика без определения изоформы фермента [Анисимова, 2002б, 2005а, 2006]. В кардиомиоцитах присутствуют ФДЭ 1-5 изоформ [Knight, 2013; Maurice, 2014]. Инотропные реакции соединений определяются в большей степени ингибированием ФДЭ 3 изоформы миокарда. Ее механизм действия связан с цАМФ-РКА-опосредованным возбуждением  $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ , который запускает выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР. Для исключения влияния на кальмодулинзависимые формы ФДЭ кардиомиоцитах (например ФДЭ 1) проводились исследования активности фосфодиэстеразы без и в присутствии кальмодулина. Поскольку миокардиальная ФДЭ-3 является мембраносвязанным белком, то для подтверждения сохранности его в гомогенате в нативной форме нами были проведены уточняющие исследования для соединений с высокой антифосфодиэстеразной активностью на сократительную активность изолированных предсердий крыс. Полученные данные по трем показателям были переведены в ранговую форму. Оценку активности соединений рассчитывали как средний ранг. Было показано, что вещество РУ-539 с большим преимуществом превосходит по средней ранговой оценке (6,7) остальные изученные соединения в 2,1 раза и более.

В исследованиях *in vitro* на гомогенате миокарда кролика соединение в концентрации  $1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$  снижало активность ФДЭ на 66,7%. В диапазоне концентраций  $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$  оказывало дозозависимое увеличение амплитуды изометрического сокращения. По

влиянию на сократительную активность изолированных предсердий крыс соединение РУ-539 оказалось активнее амринона и превосходило его как по величине  $IC_{50}$  ( $4,2 \times 10^{-7}$  М) в 6 раз, так и по терапевтическому индексу – в 1,8 раза. Структура соединения РУ-539 позиционирована как скаффолд для последующего конструирования новых высокоактивных инотропных веществ.

**На *третьем этапе* были выявлены некоторые общие закономерности между химическим строением производных бензимидазола и кардиопротекторной активностью в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической).**

В результате экспериментальных исследований и данных, полученных при проведении подструктурного анализа влияния типа ядра и заместителей на высокие уровни активности, анализа по средним и супремальным оценкам и ранговым оценкам, нами были найдены три вещества, максимально соответствующих как по вычислительным, так и по экспериментальным оценкам целевым скаффолдам различных фармакологических классов, обладающих кардиопротекторной активностью (рис. 2.9; 2.13; 2.15-2.17).

Известно о значительном влиянии ремоделирования сердца на становление, развитие и прогрессирование ССЗ и их осложнений, в том числе смертности. Так в условиях ишемии развивается ионное и гемодинамическое ремоделирование, способствующее развитию аритмий, СН. Фиброз миокарда (морфологическое ремоделирование) у больных с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью является аритмогенным субстратом. Стойкая желудочковая тахикардия вызывает нарушение гемодинамики и может способствовать ремоделированию сердца. Мерцательная аритмия повышает риск тромбоэмболических осложнений [Колбин, 2010; Шаваров, 2011; Моисеев, 2012].

Каждый лекарственный препарат имеет свой определенный имидж (уникальность, эффективность, безопасность, качество, новизну). Особенностью кардиотропных препаратов с разными основными механизмами действия является то, что если они приводят к уменьшению гипертрофии сердца, нормализации геометрии камер сердца и восстановлению электрофизиологической гомогенности миокарда, то есть замедляют процессы ремоделирования миокарда, значит они все обладают мультитаргетным



прогностически благоприятным эффектом, указывающим на уменьшение риска сердечно-сосудистых осложнений.

Поэтому были предприняты попытки выявить в рядах изученных соединений такой скаффолд, который мог бы обеспечивать высокий уровень кардиотропной активности в совокупности по всем трем активностям (антиаритмической, противоишемической, кардиотонической), то есть сконструировать интегральный скаффолд, имеющий системный характер действия. Данный скаффолд может отражать взаимоотношение трех видов активности между собой, опосредованных общей химической структурой. То есть показывать не оптимальное влияние структуры химических соединений на уровень конкретной фармакологической активности, а сцепленности этих видов активности между собой посредством общей химической структуры, характерной для высокоактивных соединений.

Системные связи реализуются через существование общего системного интегрального скаффолда. Классическим примером являются адренергические вещества, химическая структура которых, независимо от того, на какой тип рецептора они действуют и какие физиологические эффекты при стимуляции соответствующих адренорецепторов развиваются, имеет общий фрагмент - фенилалкиламин. Среди кардиотропных препаратов и соединений примером являются 10-диалкиламиноацильные производные фенотиазина, у которых преобладание антиангинальных или антиаритмических свойств зависит от заместителя в положении 2 [Каверина, 1984].

В наших исследованиях при сопоставлении всех трех полученных скаффолдов между собой действительно удалось получить интегральный системный скаффолд, детерминирующий высокий уровень кардиопротекторной активности, применительно к антифибрилляторной, противоишемической и кардиотонической активностям (рис. 2.17). Общая базовая структура представлена структурой бензимидазола, модифицированного либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей. Она может быть использована для поиска новых кардиотропных веществ ряда конденсированных и неконденсированных производных БИ, обладающих высокой кардиопротекторной активностью, и сбалансированных по трем изучаемым видам

активности.

Поскольку понятие кардиопротекции связано с профилактикой отдаленных последствий ССЗ, позволяющих улучшить прогноз заболевания, **на четвертом этапе было проведено углубленное изучение кардиопротекторных свойств соединений РУ-1355, амфедазола, РУ-539** при экспериментальной патологии (нарушениях ритма ишемического и неишемического генеза, острой и хронической изопроterenоловой интоксикации).

**Первоначально были изучены антиремоделирующие** (замедление ионного, электрофизиологического, гемодинамического и морфологического ремоделирования) **свойства соединения РУ-1355 с NHE-ингибирующей активностью** в условиях экспериментальной ишемии и сердечной недостаточности.

Прогноз и профилактика опасных для жизни нарушений ритма, таких как фибрилляции желудочков или блокады синусового и атриовентрикулярного узлов, у больных, имеющих в анамнезе ишемическую болезнь сердца или сердечную недостаточность, являются важными для продления и улучшения качества жизни [Моисеев2, 2012а,б; Carlsson, 2010]. В настоящее время для первичной профилактики опасных нарушений ритма разработана концепция *upstream* терапии [Гуревич, 2009; Моисеев2, 2011; Шаваров, 2011; Шогенов, 2011; Мазур, 2012; Nanda, 2010; Ravens, 2010; Reinhart, 2011; Heijman, 2013]. Она основана на способности неантиаритмических препаратов влиять на субстрат и факторы риска развития аритмий, тем самым модифицировать специфические пусковые механизмы, связанные с морфологическим ремоделированием, и предотвращать тахикардии, а значит снижать риск внезапной сердечной смерти. В первую очередь к ним относятся ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, статины, полиненасыщенные жирные кислоты. И эта группа может расширяться. В настоящее время представляет интерес изучение антиаритмических свойств ингибиторов натрий-водородного обменника (NHE) [Спасов, 2013г; Savelieva, 2008; Nanda, 2010]. В современной литературе опубликованы данные об антиаритмическом профиле таких избирательных блокаторов NHE как карипорид, NOE-694, ВПВ-513, FR-168888 и др., на моделях перевязки левой коронарной артерии с последующей реперфузией у экспериментальных крыс, собак, электрических фибрилляциях желудочков у крыс и стимуляции предсердий у собак [Karmazyn, 2002;

Hashimoto, 2003]. Данные соединения снижали вероятность развития индуцированной ишемией желудочковой тахикардии и постреперфузионных фибрилляций желудочков, ослабляли электрофизиологическое ремоделирование, приводили к спонтанной дефибрилляции. В меньшей степени ингибиторы NHE оказались эффективны при экспериментальных аритмиях, в механизме которых лежит «Ca<sup>2+</sup> перегрузка» неишемического генеза, например вызванных катехоламинами, или агонистами каппа-опиоидных рецепторов.

Поэтому целесообразно было изучить антиаритмические свойства ингибиторов NHE на моделях как длительной, так и кратковременной ишемии/реперфузии. Соединение РУ-1355 проявило антиаритмические и антифибрилляторные свойства. Данный эффект наблюдался как при профилактическом введении, так и уже в условиях ишемии. Вещество статистически достоверно в 1,5 раза снижало выраженность постреперфузионных нарушений ритма после длительной 60-ти минутной ишемии, подобно зонипориду. Оно предотвращало развитие фибрилляции желудочков при кратковременной ишемии (ЕД<sub>50</sub> составила 1,25 мг/кг).

В условиях ишемии миокарда порог фибрилляций снижается, а риск профибрилляторного действия у многих антиаритмических препаратов увеличивается [Моисеев2, 2010а,б, 2012а,б; Нарыжная, 2012]. В период электрических стимуляций не происходит полноценного сокращения желудочков сердца, что приводит к развитию кратковременного ишемического повреждения, а, следовательно, к активации натрий-водородного обменника [Hashimoto, 2003; Karmazyn, 2002]. Поэтому, важно было оценить влияние соединения РУ-1355 на порог электрических фибрилляций желудочков. Было показано, что вещество увеличивало данный показатель по отношению к исходным данным на 110,4% и на 90,6% по отношению к контрольным исследованиям. Оно статистически достоверно сокращало время до восстановления ритма как по отношению к исходным, так и контрольным величинам на 42,8 и 33,3% соответственно. При этом, соединение РУ-1355 превосходило зонипорид по способности увеличивать порог электрических фибрилляций на 20%, по возможности сокращать время до восстановления нормального ритма на 6% (p>0,05).

Поскольку NHE является электронейтральной системой, ее ингибирование

непосредственно не затрагивает сердечную электрическую деятельность. Анализ влияния соединений на ЭКГ позволяет косвенно судить об отсутствии воздействия ингибитора натрий-водородного обменника на потенциалзависимые каналы проводящей системы. Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг ( $ED_{50}$  на модели кратковременной ишемии/реперфузии) не влияло на параметры ЭКГ наркотизированных крыс при однократном введении. В накопительной (выше эффективной) дозе 8,75 мг/кг наблюдалось увеличение продолжительности зубца Р, интервала PQ, комплекса QRS и, соответственно, снижение ЧСС ( $p < 0,05$ ). Данный эффект может быть связан с угнетением внутрипредсердного, суправентрикулярного и внутрижелудочкового проведения в дозах, превосходящих антифибрилляторную. Подобные свойства ингибиторов NHE описаны в литературе [Hashimoto, 2003]. Автором показано, что хотя карипорид не влияет на параметры ЭКГ, но воздействуя на рефрактерный период предсердий и подавляя его укорочение, он купирует фибрилляции предсердий у собак, вызванные стимуляцией предсердий.

Аритмии представляют собой одну из форм повреждения миокарда. Стимуляция NHE кардиомиоцитов при ишемии/реперфузии и, как результат этого, «перегрузка» внутриклеточного кальция вызывают активацию механизма *re-entry*, задержанных постдеполяризаций (триггерную активность), что может приводить к развитию опасных для жизни тахиаритмий [Нарыжная, 2012]. Таким образом, в наших исследованиях было показано, что соединение РУ-1355 подобно селективному ингибитору NHE зонипориду оказалось эффективно на экспериментальных моделях нарушений ритма ишемического генеза, увеличивало порог фибрилляций. При этом не влияло на основные параметры ЭКГ. Можно предположить, что вещество не оказывает прямого антиаритмического действия. Его эффекты в большей степени опосредованы противоишемическими свойствами. Способность ограничивать кальциевую перегрузку и тем самым предотвращать развитие опасных нарушений ритма в условиях ишемического и реперфузионного повреждения расширяет механизмы его кардиопротекторного действия.

В настоящее время при рассмотрении патогенеза СН большое внимание уделяется самым ранним ее проявлениям. Все чаще говорят о том, что в результате миокардиального стресса (увеличение ЛЖД и объемной нагрузки, окислительный стресс, острый инфаркт

миокарда и др.) активируются механические и нейрогуморальные сигнальные каскады, которые перекрываются между собой и запускают формирование патогенетического континуума, приводящего к развитию гипертрофии миокарда и его ремоделированию [Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Mann, 2010]. Основными эффекторными механизмами сигнальной трансдукции при ХСН, подвергаемыми наибольшим изменениям, являются сопряжение возбуждение-сокращение, сократительный аппарат, образование энергии, мобилизация кальция, метаболизм, рост и апоптоз. Кроме того, мишенями считаются транскрипционные факторы, коактиваторы и корепрессоры генной экспрессии кардиомиоцитов, центральные и периферические механизмы регуляции [Morita, 2005; Mann, 2010, 2012, 2014]. Ремоделирование миокарда полностью связано с нарушением метаболизма, ионных токов, энергообеспечения и т.д. [Шляхто, 2005; Сонин, 2009, 2010]. Ионное ремоделирование миокарда связано с изменением функциональной активности каналов и регуляторных белков, нарушением их экспрессии. Особое значение имеет нарушение внутриклеточного депонирования и высвобождения кальция, связанное с дисфункцией  $\text{Ca}^{2+}$  АТФазы СРР (SERCA),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, рианодиновых рецепторов, координации сократительных белков.

При оценке роли NHE можно сказать, что в условиях ХСН происходит активация симпатической нервной системы и, как следствие, факторов, провоцирующих гипертрофию и ремоделирование миокарда, таких как эндотелин I [Khandoudi, 1994; Wu, 1993; Ito, 1997], ангиотензин II [Boston, 1998; Mattiazi, 1997], альфа-1-агонисты [Wallert, 1992; Puceat, 1995; Yokoama, 1998], факторы роста (трансформирующий фактор роста  $\beta_1$ , инсулиноподобный фактор роста и др.) [Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012; Wakabayashi, 1992; Osadchii, 2007a,b]. Они стимулируют соответствующие рецепторы и активируют NHE-1, что приводит к повышению концентрации натрия. Это, в свою очередь, активирует ядерные факторы транскрипции и повышает уровень внутриклеточного кальция. Рост внутриклеточной концентрации кальция приводит к активации факторов, стимулирующих гипертрофию (кальцийневрин, CaMKII), повышает проницаемость митохондриальной мембраны и приводит к ремоделированию митохондрий. Позднее усиливается продукция свободных радикалов, что вместе с действием активированных факторов транскрипции приводит к гипертрофии миокарда [Karmazyn, 2008]. Дальнейшее прогрессирование

сердечной гипертрофии приводит к сердечной недостаточности, являясь следствием нарушением  $\text{Ca}^{2+}$  обмена, некротического повреждения миокарда и увеличения его жесткости за счет интерстициального фиброза [Osadchii, 2007a,b].

Поэтому при оценке кардиопротекторных эффектов соединений в условиях СН необходимо учитывать влияние на сократительную активность и функциональные резервы, маркеры повреждения и образование реактивных форм кислорода, морфологические изменения в миокарде.

У животных с изопротереноловой ХСН (ИЗО 2,5 мг/кг 2 раза в сутки 28 дней) при увеличении пред- и постнагрузки соединение РУ-1355 после курсового введения (31 день) в диапазоне доз 1,25-5 мг/кг/сутки улучшало сократительную активность и функциональные резервы миокарда. В условиях нагрузки объемом (преднагрузки) вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки увеличивало ЛЖД,  $\text{dp/dt}^+$ , МИФС в 2,5, 3,2, и 4,7 раза соответственно активнее ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой с ИЗО. При повышении дозы вводимого соединения наблюдался значимый ( $p < 0,05$ ) рост  $\text{dp/dt}^-$  и МИФС в 4,6 и 1,5 раза, по сравнению с животными, получавшими меньшую дозу. При сравнении с препаратами, применяемыми в качестве кардиопротекторов, соединение РУ-1355 оказывало эффект, подобный милдронату, и превосходило предуктал.

В условиях максимальной изометрической нагрузки (постнагрузки) соединение РУ-1355 (в диапазоне доз 1,25-5,0 мг/кг/сутки) улучшало сократимость миокарда животных с СН, вызванной ИЗО, и сохраняло ее на достаточно высоком уровне. По сохранности эффекта (значению площади под фармакодинамическими кривыми прироста показателей сократимости ( $\text{dp/dt}^+$ ,  $\text{dp/dt}^-$ )) изучаемое вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки статистически значимо превосходило полученные результаты у контрольных животных с ИЗО в 2,7 и 2,1 раза. При сравнительной оценке эффектов выявлено, что соединение РУ-1355 оказывало эффект подобный предукталу и превосходило милдронат по способности длительно удерживать нагрузку.

Снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР и нарушение его высвобождения при СН приводит к ослаблению силы и скорости сокращения [Сонин, 2009, 2010; Харченко, 2012]. Замедление в конце систолы обратного возврата в СПР  $\text{Ca}^{2+}$  через SERCA и диастолическая "утечка"  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР через рианодиновые рецепторы вызывают нарушения процессов расслабления.

При этом диастолическая дисфункция как правило преобладает [Шилов, 2011; Капелько, 2014]. В наших исследованиях было показано, что соединение РУ-1355 при проведении нагрузок статистически значимо увеличивало  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , то есть уменьшало сократительную дисфункцию, что может свидетельствовать об его влиянии на гомеостаз кальция.

По итогам двух нагрузок (суммарной площади под кривой прироста эффекта) показано, что соединение РУ-1355 не только улучшало сократимость миокарда животных с СН, вызванной ИЗО, но и статистически значимо сохраняло ее на достаточно высоком уровне, то есть способствовало увеличению функциональных резервов сердца. В дозе 1,25 мг/кг/сутки практически не уступало препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходило их по основным показателям.

Поскольку СН является системным синдромом, для его выявления был использован показатель повреждения кардиомиоцитов - кардиоспецифический тропонин I. Соединение РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг наиболее активно ограничивало рост маркера повреждения миокарда тропонина I в плазме крови и превосходило эффект предуктала и милдроната в 2,2 и 2,5 раза, соответственно.

Считается, что в условиях сниженного образования макроэргических фосфатов и перегрузки кардиомиоцитов ионами кальция возникают нарушения образования и распределения реактивных форм кислорода и происходит формирование окислительного стресса в самом сердце и сосудистой системе [Капелько, 2010; Сажин, 2011; Новиков, 2013; Писаренко, 2013]. Повышение уровня вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов - МДА - у животных с СН свидетельствует об усиленном образовании активных форм кислорода.

Изучаемое вещество снижало интенсивность перекисного окисления липидов подобно предукталу и милдронату. Уровень МДА в ткани миокарда животных с СН, получавших вещество в дозе 1,25 мг/кг/сутки, был в 1,7 раза ниже чем у контрольных, в дозе 5,0 мг/кг/сутки - в 1,9 раза ( $p<0,05$ ).

Ремоделирование желудочков при СН связано с гипертрофией кардиомиоцитов, некрозом и апоптозом клеток, интерстициальным фиброзом и деградацией коллагена [Шляхто, 2005; Харченко, 2012; Osadchii, 2007a,b]. Изменение геометрии, объема и массы на

начальных этапах являются адаптивными механизмами в условиях роста ЛЖД и ОЦК, однако при хронической стимуляции сигнальных путей возникают нарушения функции кардиомиоцитов и их утрата в результате апоптоза, аутофагии, некроза, гипертрофии оставшихся миоцитов, процесс становится дизадаптивным и способствует утяжелению прогноза [Сонин, 2009, 2010; Цыпленкова, 2013; McKinsey, 2005; Mann, 2010].

При проведении морфологических исследований показано, что при курсовом введении исследуемого соединения снижается образование соединительной ткани (в том числе коллагена). Наиболее активно соединение РУ-1355 ограничивало фиброзирование левого желудочка в дозе 5 мг/кг. По выраженности эффекта вещество оказалось подобно предукталу и превосходило милдронат.

Механизм действия ингибиторов NHE при ХСН связан с регуляцией внутриклеточного обмена кальция и снижением активности прогипертрофических факторов. Ингибируя NHE-1, соединение РУ-1355, вероятно, нормализует внутриклеточный обмен кальция, что приводит к улучшению сократимости миокарда животных с ХСН и увеличению функциональных резервов сердца. Изучаемое вещество вероятно ограничивает влияние прогипертрофических факторов, тем самым способствует уменьшению степени обратимых и необратимых повреждений кардиомиоцитов и, как следствие, снижению объема формирующейся грануляционной ткани в миокарде, а в последующем к меньшей выраженности кардиосклероза (фиброза) и сердечной недостаточности. Ограничение роста уровня Тн I и МДА подтверждает снижение повреждающего действия на сердце.

При изучении общетоксикологических свойств было показано, что соединение РУ-1355 в эффективных дозах (1 и 5 мг/кг) не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. Кардиодепрессивных и аритмогенных свойств не выявлено.

Таким образом, соединение РУ-1355 обладает противоишемическими, противоаритмическими, антифибрилляторными и антигипертрофическими свойствами, что и определяет его кардиопротекторный эффект. Предполагаемый механизм действия связан с ограничением избыточного поступления кальция внутрь кардиомиоцитов при



ишемическом и неишемическом повреждении миокарда, нормализации его обмена, а также с ограничением активации профибротических факторов.

**В последующем были изучены ионотропные и противофибрилляторные свойства амфедазола**, в том числе в условиях ишемии миокарда.

При сравнительном изучении влияния амфедазола на трансмембранные ионные токи проф. Поротиковым В.И. было показано сложное амиодароноподобное мембранотропное действие, отличное от других известных антиаритмических препаратов: выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция. При введении амфедазола в дозе  $1 \cdot 10^{-6}$  М калиевый ток уменьшался на 39%, в дозе  $5 \cdot 10^{-5}$  М был заблокирован на 60%. Угнетение калиевого тока в присутствие изучаемого вещества было подобно эффекту хинидина, а эффективные концентрации одного порядка (для хинидина  $3 \cdot 10^{-6}$  М) [Анисимова, 2009]. Амиодарон оказывает подобное влияние на калиевые токи в близких веществу концентрациях [Baxton, 1982].

В исследованиях *in vivo* на моделях суправентрикулярных и вентрикулярных фибрилляций, в том числе при ишемическом повреждении миокарда, амфедазол оказывал выраженный антифибрилляторный эффект и превосходил препарат сравнения амиодарон по своей активности (табл. 7.1).

На модели фибрилляций предсердий, вызванных электростимуляцией, вещество при внутривенном введении (МЭК=0,91 мг/кг) в 100% случаев восстанавливало синусовый ритм, превосходило амиодарон как по показателям минимальной эффективной дозы (в 8,5 раза), так и величине терапевтического индекса. При внутривенном введении аконитина, амфедазол проявил антифибрилляторный эффект и оказался активнее амиодарона по величине  $ED_{50}$  (0,3 мг/кг) в 33,3 раза, по терапевтическому индексу в 4,2 раза. Вещество предотвращало развитие постреперфузионных аритмий при профилактическом введении на модели кратковременной ишемии/реперфузии миокарда ( $ED_{50} = 0,2$  мг/кг) и оказалось активнее амиодарона как по величине  $ED_{50}$  в 9 раз, так и по терапевтическому индексу.

Высокая способность увеличивать порог фибрилляций желудочков и снижать максимально воспроизводимую частоту, косвенно свидетельствует о влиянии на эффективный рефрактерный период и возбудимость миокарда. В дозах, эквивалентных 1/5-

1/6 ЛД<sub>50</sub>, амфедазол повышал электрический порог фибрилляций желудочков и превосходил лидокаин как по абсолютной величине в 3 раза, так и по длительности эффекта в 3-4 раза. Кроме того, вещество статистически достоверно снижало максимально воспроизводимую частоту сердцебиений на 40% подобно лидокаину и превосходило по длительности эффекта в 2 раза.

Таблица 7.1

### Антифибрилляторная активность амфедазола

№	Вид исследования или модель нарушения ритма	Амфедазол		Амиодарон	
		активность	УТИ*	активность	УТИ*
1.	Влияние на возбудимость изолированных предсердий крыс, МЭК, М	$1,6 \cdot 10^{-5}$	2,6**	$1,7 \cdot 10^{-4}$	1,2**
2.	Фибрилляции, вызванные электрической стимуляцией предсердий у кошек, МЭД, мг/кг	0,9±0,16	18,7	7,7±0,66	17,6
3.	Фибрилляции, вызванные внутривенным введением аконитина у крыс, ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	0,3	56,7	10,0	13,5
4.	Постреперфузионные желудочковых нарушения ритма у крыс, ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	0,2	85,0	1,8	75,3

\* - УТИ=ЛД<sub>50</sub>/МЭД (или ЕД<sub>50</sub>);

\*\* - МЭД (мг/л)=МЭК (моль/л) x Mr<sub>соединения</sub> (мг/моль)

При анализе полученных результатов можно предположить, что амфедазол ограничивает электрофизиологическое ремоделирование миокарда. Подтверждением данного факта могут являться следующие результаты: непосредственное дозозависимое блокирующее влияние *in vitro* на калиевые токи; выраженная антифибрилляторная активность на моделях аритмий ишемического и неишемического генеза; высокая способность увеличивать порог фибрилляций желудочков и снижать максимально воспроизводимую частоту.

Можно предположить у амфедазола амиодароноподобный механизм действия. В основе его будет удлинение фаз 2 и 3 реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов

и, соответственно, увеличение его общей продолжительности за счет блокады калиевых каналов. В высоких концентрациях изучаемое вещество может оказывать влияния на фазу быстрой деполяризации (фаза 0 потенциала действия), так как в ее формировании в пейсмейкерных клетках участвуют ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Снижения частоты синусового ритма под действием соединения может быть связано с угнетением ионных токов фазы 4 потенциала действия (спонтанной диастолической деполяризации), определяющих автоматическую функцию синусового узла.

Кроме антифибрилляторной активности, в экспериментах по изучению влияния на течение ишемического повреждения (ионное ремоделирование) миокарда при дозированной окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии амфедазол проявил противоишемический эффект. Изучаемое вещество превосходило амиодарон по величине  $\text{ED}_{50}$  (2,1 мг/кг) в 12 раз, по терапевтическому индексу – в 1,5 раза.

При изучении общетоксикологических свойств амфедазола в эффективных дозах (0,17 и 0,85 мг/кг) было показано, что он не влиял на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. Соединение снижало частоту сердечных сокращений у крыс при длительном введении, что, вероятно, связано с влиянием на эффективный рефрактерный период миокарда. В средней эффективной дозе 0,6 мг/кг вещество не влияло на показатели сократимости сердца у интактных кошек; а в условиях коронарогенного повреждения миокарда незначительно снижает их. Ограничение насосной функции ишемизированного сердца в определенных пределах может быть благоприятным фактором, так как уменьшение нагрузки на миокард приводит к снижению потребления кислорода.

Таким образом, амфедазол может быть отнесено к антиаритмическим веществам III класса. Оно обладает кардиопротекторными (антиремоделирующими) - выраженными антифибрилляторными и умеренными противоишемическими - свойствами, что является перспективным для дальнейшего доклинического изучения.

Способность препарата улучшать сократимость и при этом сохранять функциональные резервы в условиях повреждения миокарда может рассматриваться как

фактор кардиопротекции. Поэтому в заключении были **изучены инотропные свойства соединения РУ-539** в условиях острой интоксикации изопротеренолом.

В основе острого изопротеренолового (ISO) повреждения миокарда лежат некоронарогенный некроз миокарда [Назипова, 1998; Казаченко, 2008; Scheuer, 1999; Senthil, 2007; Osadchii, 2007a,b; Mehdizadeh, 2013]. Высокие дозы ISO вызывают выраженную тахикардию, связанную со снижением давления крови в аорте. При этом развивается несоответствие между увеличенной потребностью миокарда в кислороде и снижением коронарного кровотока. Ишемия усиливается, некроз кардиомиоцитов продолжается. Резко снижается сократительная активность и могут появиться симптомы острой сердечной недостаточности [Osadchii, 2007a,b].

Для выявления кардиопротекторных свойств соединения РУ-539 необходимо было изучить его влияние на сократительную активность и функциональные резервы сердца в условиях некоронарогенного некроза миокарда.

При увеличении преднагрузки (нагрузка объемом) соединение РУ-539 (0,42 мг/кг, однократно) улучшало сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией. Об этом свидетельствует статистически значимое увеличение ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ , а также  $AD_{\text{сист}}$ ,  $AD_{\text{диаст}}$ ,  $AD_{\text{ср}}$  в 2,7; 2,6; 2,4; 4,2; 2,4; 2,3 раза соответственно, в группе животных, получавших вещество по сравнению с контрольной группой с ISO. Соединение РУ-539 превосходило амринон по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,88%, скорости увеличения сократимости миокарда - на 17,00% и скорости его расслабления – на 74,09%, по динамике МИФС – на 70,99%.

В тесте на адренореактивность соединение РУ-539 у животных с изопротереноловым повреждением миокарда значимо ограничивало чрезмерный рост ЧСС и МИФС по отношению к контрольным исследованиям, что может расцениваться как кардиопротекторное действие. Вещество превосходило амринон по максимальным значениям прироста таких показателей сократимости миокарда как ЛЖД и  $dp/dt-$  в 1,4 и 2,4 раза соответственно.

При проведении постнагрузки (максимальной изометрической нагрузки) по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости сокращения, ЧСС и МИФС соединение РУ-539 оказало эффект подобный амринону и превосходило его по способности

сохранять сократимость миокарда животных с изопротереноловой ишемией на достаточно высоком уровне. По основным показателям сократимости к концу нагрузки (ЛЖД,  $dp/dt+$ ,  $dp/dt-$ ) изучаемое вещество статистически значимо превосходило эффект у контрольных животных с изопротеренолом в 2,9; 15,0; 4,4 раза. Изучаемое вещество при введении животным с изопротереноловой ишемией миокарда способствовало увеличению функциональных резервов сердца без увеличения ЧСС, улучшало диастолическую функцию.

В итоге, у животных с изопротереноловой ишемией миокарда соединение РУ-539 при проведении функциональных тестов способствовало улучшению сократимости миокарда в систолу и скорости его расслабления в диастолу. Обращает на себя внимание тот факт, что РУ-539 улучшает диастолическую функцию более выражено, чем препарат сравнения амринон. Известно, что быстрое и полное расслабление миокарда является необходимым условием для сердечного выброса, адаптации к изменениям в условиях нагрузки, инотропной стимуляции и частоты сердечных сокращений [Chemla, 2000] и является свидетельством наличия кардиопротекторного действия. Соединение РУ-539 при проведении функциональных тестов не только улучшало сократительную активность миокарда, но и способствовало сохранению функциональных резервов, о чем свидетельствует увеличение МИФС без дополнительного увеличения ЧСС и, вероятно, связано с ограничением ионного ремоделирования миокарда.

При изучении кардиотоксичности соединения РУ-539 у интактных животных в дозе, равной двум эффективным, в условиях проведения гемодинамических нагрузок, сократимость миокарда статистически значимо не отличалась от контрольной группы.

Выявленные свойства дают основание предположить, что соединение РУ-539 - кардиотоническое соединение ингибитор ФДЭ с кардиопротекторными свойствами – является перспективным для дальнейшего изучения с целью применения новых подходов в терапии сердечной недостаточности.

Для оценки широты терапевтического действия, позволяющей варьировать диапазон доз и обеспечивать хорошую переносимость, была изучена острая токсичность. По величине  $LD_{50}$  в соответствии с классификацией токсичности веществ по Березовской [2003, 2010] исследуемые производные бензимидазола (соединения РУ-1355, амфедазол,

РУ-539) можно отнести к классу умеренно токсичных (3 класс)

Таким образом, данные, полученные в исследованиях *in vitro*, данные виртуального скрининга, подструктурных анализов влияния типа ядра и заместителей на высокие уровни активности, анализа по средним и супремальным оценкам, ранговым исследованиям *in silico*, в совокупности с литературными данными, позволяют с достаточно высокой степенью вероятности утверждать, что производным бензимидазола присущи кардиопротекторные свойства. Механизмы реализации защиты миокарда, такие как способность влиять на трансмембранные ионные токи и увеличивать продолжительность рефрактерного периода предсердий, ингибировать NHE-1 или ФДЭ кардиомиоцитов, зависят от химической структуры соединений.

При этом в качестве ядра найденных нами противоишемических, антифибрилляторных и инотропных соединений с кардиопротекторной активностью рассматривается привилегированная молекула бензимидазола. Данная подструктура является основным фрагментом химической структуры активного соединения. При ее модификации либо путем введения заместителей, либо путем конденсации с имидазольным циклом, с образованием трициклических систем и последующим введением в них заместителей, возможно построить скаффолды соединений с высокой избирательной активностью в отношении трансмембранных ионных токов, NHE-1, ФДЭ.

Кардиопротекторная универсальность базовой структуры бензимидазола, вероятно, обусловлена особенностями связывания с биомишенями соединений, содержащих привилегированные подструктуры. На первом этапе происходит фиксация привилегированного фрагмента в так называемом «привилегированном подкармане» [Bondensgaard, 2004]. Характер такого связывания неспецифический, он лимитируется в основном гидрофобными и стерическими взаимодействиями, обеспечивает прочную фиксацию лиганда на белке и не приводит к появлению внешней активности. На втором этапе происходит взаимодействие варибельной части молекулы со специфическим карманом сайта связывания [Bywater, 2006]. В сравнении с привилегированным подкарманом, специфический карман по аминокислотному составу менее консервативен, он характеризуется большей энтропией, обеспечивает селективное взаимодействие лиганда с биомишенью и обуславливает проявление внешней активности. Таким образом,

интегральный скаффолд кардиопротекторной активности включает в себя как привилегированный, «фиксирующий» фрагмент бензимидазола, так и специфическую, «активирующую» часть действующего соединения.

На основе скаффолда возможно создание комбинаторных библиотек для выявления наиболее привлекательного по своим динамическим, кинетическим и токсикологическим параметрам соединения.

При построении комбинаторных библиотек для дальнейшего направленного поиска веществ с антиаритмической активностью среди конденсированных бензимидазолов наиболее предпочтительными выглядят группы производных N<sup>9</sup>-ИМБИ и N<sup>1</sup>-ИМБИ. Достоверным общими для них признаками высокой активности являются в положении C<sup>2</sup> - фенильный - и в положении N<sup>9</sup> или N<sup>1</sup> - диэтиламиноэтильный - заместители. Для дальнейшего поиска веществ с NHE-ингибирующей активностью среди бензимидазолов наиболее перспективной представляется группа 2-амино-бензимидазола, содержащая в положении N<sup>1</sup> морфолиноэтильный заместитель.

Результаты расширенных фармакологических исследований соединения РУ-1355 с выраженной NHE-ингибирующей активностью, проявляющего на моделях *in vivo* выраженные противоишемические и антиремоделирующие (рис. 7.1) свойства, делают перспективным его использование в качестве основы для создания нового кардиопротекторного средства для ограничения ишемического повреждения миокарда и профилактики осложнений.

Результаты фармакологических исследований амфедазола, проявляющее свойства антиаритмического вещества III класса со сложным мембранотропным действием, и демонстрирующего в ходе исследований *in vivo* выраженные антифибрилляторные и антиремоделирующие эффекты, позволяют рассматривать данное вещество как перспективную основу для создания лекарственного средства для профилактики и лечения нарушений ритма ишемического генеза, в том числе фибрилляций.

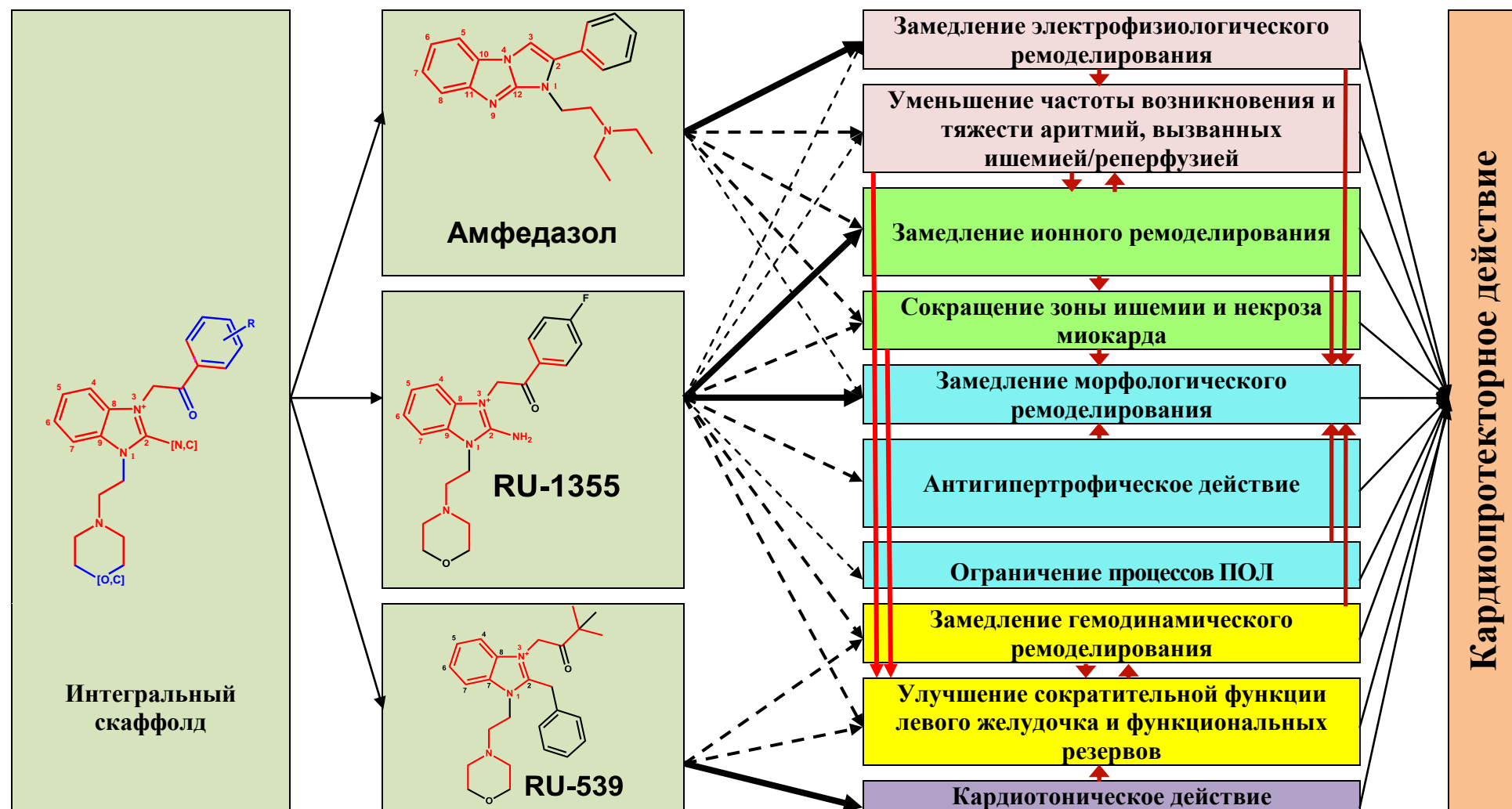


Рисунок 7.1. Интегральный скелет соединений с кардиопротекторной активностью. Основные кардиопротекторные эффекты (→) и механизмы их реализации (--- → - наиболее значимые и - → значимые эффекты) производными бензимидазола



Результаты фармакологических исследований соединения РУ-539 с антифосфодиэстеразной активностью, повышающего *in vivo* сократительную активность и функциональные резервы миокарда, позволяют рассматривать данное вещество в качестве основы для создания нового лекарственного препарата с положительным инотропным эффектом для эффективной терапии сердечной недостаточности.

Совместное использование методов медицинской химии и фармакологии позволяет перевести направленный поиск новых биологически активных соединений в классе конденсированных и неконденсированных производных БИ на качественно новый уровень системного поиска.

## ВЫВОДЫ:

1. Консенсусный прогноз спектра активностей с помощью системы PASS и ИТ Микрокосм по сходству к референсным препаратам для 1393 конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола ( $N^1$ -бензимидазола; 2,3-дигидро- $N^1$ -бензимидазола;  $N^9$ -имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола;  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола;  $N^1$ -имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола;  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо-[1,2-*a*]бензимидазола; пиразоло[1,5-*a*]бензимидазола; пиролло[1,2-*a*] бензимидазола; тиазоло[3,2-*a*]бензимидазола; 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазола; пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола,  $N^1, N^9$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) позволил установить, что 93,5% соединений могут проявлять антиаритмическую, 80,8% - кардиотоническую, 42,1% - противоишемическую активности, а данный класс является перспективным для проведения экспериментального поиска кардиопротекторов.

2. Наиболее перспективными для поиска веществ, увеличивающих рефрактерность миокарда, являются производные  $N^9$ - имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и  $N^1$ -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, содержащих в положении  $C^2$  - фенильный - и в положении  $N^9$  или  $N^1$  - диэтиламиноэтильный заместители.

3. Соединение 1-(2-диэтиламиноэтил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – амфедазол - интенсивно влияет на возбудимость изолированных предсердий и превосходит амиодарон по величине минимальной эффективной концентрации в 10 раз; в дозе  $5 \cdot 10^{-5}$  М блокирует трансмембранные ионные токи калия на 60%.

4. Установлено, что среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов высокоактивные ингибиторы NHE-1 наиболее часто встречаются среди  $N^1$ -замещенных 2-аминобензимидазолов, содержащих в качестве значимого заместителя в положении  $N^1$  морфолиноэтильный заместитель.

5. Соединение 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)-бензимидазолия хлорид - РУ-1355 - активно ингибирует NHE-1 тромбоцитов кролика ( $IC_{50} = 5,4 \cdot 10^{-10}$  М) и превосходит препарат сравнения зонипорид в 50 раз; у животных с длительной ишемией/реперфузией левой коронарной артерии статистически достоверно снижает тяжесть постреперфузионных нарушений ритма на 53%, уменьшает размер зоны некроза

миокарда в 1,8 раза, ограничивает рост концентрации тропонина I в плазме крови в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой.

6. Среди 60 конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов, ингибирующих ФДЭ, наибольшую положительную инотропную активность проявляет соединение 2-бензил-1-морфолиноэтил-3-пивалоилметил-бензимидазолия бромид - РУ-539, которое дозозависимо увеличивает амплитуду изометрического сокращения изолированных предсердий и активнее амринона по величине  $IC_{50}$  в 6 раз.

7. Кардиопротекторные (антиремоделирующие) свойства соединения РУ-1355 связаны с противоишемическими, противоаритмическими, антифибрилляторными свойствами и способностью препятствовать гипертрофии миокарда. В исследованиях *in vivo* у животных с кратковременной ишемией/реперфузией левой коронарной артерии вещество РУ-1355 статистически достоверно предотвращает развитие постреперфузионных фибрилляций ( $ED_{50}$  1,25 мг/кг); увеличивает порог электрических фибрилляций по отношению к контрольной группе животных на 90,6% и статистически достоверно сокращает время до восстановления нормального ритма на 33,3%. При увеличении пред- и постнагрузки соединение РУ-1355, предуктал и милдронат улучшают сократимость миокарда животных с хронической изопротереноловой интоксикацией. В дозе 1,25 мг/кг/сутки соединение РУ-1355 практически не уступает препаратам сравнения предукталу и милдронату, а в дозе 5 мг/кг/сутки превосходит их по влиянию на основные показатели (улучшение сократимости миокарда, ограничение роста уровней тропонина I и малонового диальдегида, снижение плотности коллагена).

8. Амфедазол можно отнести к антиаритмическим препаратам III класса со сложным мембранотропным действием, ограничивающим процессы электрофизиологического ремоделирования миокарда. На моделях нарушений ритма неишемического и ишемического генеза амфедазол превосходит препарат сравнения амиодарон по эффективной дозе в 8,5 и более раза. Соединение увеличивает порог электрических фибрилляций в дозе 3 мг/кг в 20 раз. Вещество увеличивает продолжительность интервала  $QT_c$  на 10% в дозе 0,85 мг/кг. Амфедазол проявляет противоишемический эффект при дозируемой окклюзии нисходящей ветви левой

коронарной артерии и превосходит амиодарон по величине  $ED_{40}$  (2,1 мг/кг) в 12 раз.

9. Кардиопротекторные свойства соединения РУ-539 связаны со способностью ослаблять гемодинамическое ремоделирование миокарда. У животных с некоронарогенным повреждением миокарда вещество при проведении нагрузочных тестов статистически значительно улучшает сократительную активность миокарда и улучшает функциональные резервы сердца (увеличивает МИФС без дополнительного увеличения ЧСС). В условиях нагрузки объемом изучаемое вещество превосходит амрион по максимальным значениям прироста ЛЖД на 50,88%, скорости увеличения сократимости миокарда на 17% и скорости его расслабления на 74,09%, по динамике МИФС на 70,99%. В тесте на адренореактивность соединение РУ-539 превосходит амрион по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости расслабления, МИФС в 1,4; 2,4 и 1,5 раза соответственно. При проведении теста постнагрузки по максимальным показателям прироста ЛЖД, скорости сокращения, ЧСС и МИФС соединение РУ-539 оказывает эффект подобный амриону и превосходит его по способности сохранять сократимость на достаточно высоком уровне.

10. По величине  $LD_{50}$  в соответствии с классификацией токсичности веществ по Березовской исследуемые производные бензимидазола соединения РУ-1355, амфедазол, РУ-539 относятся к умеренно токсичным (3 класс).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданная база данных соединений, обладающих NHE-1 ингибирующими свойствами, влияющих на рефрактерность изолированных предсердий крыс, сократимость изолированных предсердий крыс у соединений с антифосфодиэстеразной активностью, может быть использована для прогноза данных видов активности у вновь синтезированных веществ.

Методология поиска веществ, влияющих на рефрактерность миокарда, NHE-1, сократимость миокарда, может быть использована при проведении направленного поиска соединений с кардиопротекторной активностью.

Выявленные *in silico* значимые признаки высокого уровня NHE-ингибирующего и антиаритмического эффектов рекомендуется использовать для направленного синтеза соединений с данными видами активности.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности дальнейшего доклинического (фармакокинетического, токсикологического, фармацевтического) изучения соединений под лабораторными шифрами РУ-1355, амфедазол, РУ-539.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдюкова, А.Н. Гемодинамические и эндотелийпротективные эффекты  $\beta$ -адреноблокаторов у больных ишемической болезнью сердца, осложнённой хронической сердечной недостаточностью и фибрилляцией предсердий/ А.Н. Абдюкова, Э.Р. Закирова //Кардиосоматика. - 2010. - №1. - С. 65-69.
2. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуратовой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун// Лабораторное дело. - 1988. - № 11. - С. 41-43.
3. Анисимова, В.А. Исследования в области производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. XXX. синтез и свойства производных (имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-2) уксусных кислот / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов [и др.] // Биоорганическая химия. - 2011. - Т. 37, № 6. - С. 836-843.
4. Анисимова, В.А. Синтез и биологическая активность 9-диалкиламиноэтил-2-окси(диокси)фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола/ В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. - 2006. - Т. 40, № 10. - С.3-10.
5. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 1- и 10-N-замещённых 1(10),2,3,4-тетрагидропиримидо [1,2-*a*]бензимидазола / В.А. Анисимова, М.М. Осипова, А.А. Спасов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2002а. – Т. 36, № 9. - С. 11-16.
6. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 10 - алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо-[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгина, А.А. Спасов и [и др.]// Хим.-фарм. журнал. - 2012. - Т. 46, № 6. - С. 54-59.
7. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 2-гетарилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, А.Ф. Турчаева [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2002б. – Т. 36, № 10. - С. 12–17.
8. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 2-метоксии 2-оксифенилзамещённых 1-диалкиламиноалкилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов/ В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2005а. - Т. 39, № 11. - С. 17-23.
9. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность дигидрохлоридов 3-(2,2,2-трихлор-1-гидроксиэтил)имидазо[1,2-*a*] бензимидазола / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. - 2009. - Т. 43, № 9. - С. 9-12.

10. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и промежуточных продуктов их синтеза / В.А. Анисимова, М.В. Левченко, Г.В. Ковалёв [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 1987. - Т. 21, № 3. - С. 313-319.
11. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность солей 3-ацетил-2-*R*-9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. - 2010. - Т. 44, № 3. - С. 8-13.
12. Анисимова, В.А. Фармакологическая активность 2-метоксифенилзамещенных 9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2005б. - Т. 39, № 9. - С. 26-32.
13. Антипова, Т.А. Селективный анксиолитик афобазол увеличивает содержание BDNF и NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии ИТ-22 / Т.А. Антипова, Д.С. Сапожникова, Л.Ю. Бахтина, С.Б. Середенин // Экспер. и клин. фармакология. - 2009. - Т 72, №1. - С. 12-14.
14. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова[и др.] // В Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.:Гриф и К. - 2012. - С. 385-416.
15. Бакшеев, В.И. Ингибиторы фосфодиэстераза - реалии и перспективы использования в клинической практике: часть 1/ В.И. Бакшеев, Н.М. Колomoец // Клиническая медицина: научно – практический журнал. -2007. - Т. 85, № 3. - С.4-11.
16. Балаболкин, М.И. Роль Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-обменника в патогенезе сахарного диабета 2 типа / М.И. Балаболкин, М.Ф. Белоярцева// Сахарный диабет. - 2001. - № 2.- С. 49-55.
17. Беленков, Ю.Н. Лечение сердечной недостаточности в XXI веке: достижения, вопросы и уроки доказательной медицины / Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев // Кардиология. - 2008. - № 2. - С. 6-16.
18. Беленький, М.Л. В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький.–2-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Медгиз, 1963. – 146 с.
19. Белоусов, Ю.Б. Фармакоэкономический анализ применения левосимендана у больных с тяжёлой декомпенсированной хронической сердечной недостаточностью / Ю.Б.

Белоусов, Д.Ю. Белоусов, В.Ю. Григорьев // Сердечная недостаточность. - 2006. –Т. 35, № 1.- С. 32-38.

20. Бердяев, С.Ю. Боннекор - новый антиаритмический препарат / С.Ю. Бердяев, В.В. Лысковцев, З.П. Сенова [и др.] // Фармакол. и токсикол. - 1990. - Т. 53, № 3. - С. 33-36.

21. Бердяев, С.Ю. Электрофизиологическое исследование антиаритмических свойств боннекора - нового производного дибензазепина / С.Ю. Бердяев, Р. Марко, К. Келемен [и др.] // Кардиология. - 1986. - Т. 26, № 8. - С. 16-19.

22. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. - 2003. - Т. 37, №3. - С. 32-34.

23. Бойцов, С.А. Динамика сердечно-сосудистой смертности среди мужчин и женщин в субъектах Российской Федерации (2002-2011 гг.)/ С.А. Бойцов, И.В. Самородская // Кардиология. – 2014. – №4. – с. 4-9.

24. Бойцов, С.А. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования / С.А. Бойцов, Е.И. Чазов, Е.В. Шляхто [и др.] // Профилактическая медицина. – 2013. - Т. 16, № 6. - С. 27-34.

25. Бунин, Ю.А. Комбинированная профилактическая антиаритмическая терапия фибрилляции и трепетания предсердий /Ю.А. Бунин, Л.Ф. Федякина // Российский кардиологический журнал. - 2006. –Т. 62, № 6. - С. 35-45.

26. Бунин, Ю.А. Лечение фибрилляции предсердий: современные направления антиаритмической терапии / Ю.А. Бунин // Актуальные вопросы сердца и сосудов. - 2010. - № 4. - С. 16-21.

27. Бунин, Ю.А. Фармакотерапия наджелудочковых тахикардий / Ю.А. Бунин // Российский кардиологический журнал. - 2009. –Т. 77, № 3. - С. 80-88.

28. Вайль, С.С. Руководство по патолого-гистологической технике / С.С. Вайль// Л., Медгиз, 1947. - 264 с.

29. Васильев П.М. Поиск *in silico* лигандов P2Y<sub>1</sub>-рецепторов //В книге: P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Рецепторы. Молекулярно-биологические, химические и фармакологические



аспекты. под ред. А.А. Спасова. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, Deutschland. – 2013. – Гл. 4. – С. 69-103.

30. Программа ИТ «Микрокосм»: Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011618547 / П.М. Васильев, А.Н. Кочетков (Россия). – № 201616643; заявл. 02.09.2011; зарег. 31.10.2011., опубл. 20.03.2012 RU ОБПБТ. - № 1(78)– 1 с.

31. Васильев, П.М. Информационная технология прогноза фармакологической активности химических соединений: Дис. ... док.биол. наук /Васильев Павел Михайлович. - Волгоград, 2009. - 428 с.

32. Васильев, П.М. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов / П.М. Васильев, А.А. Спасов, К.В. Ленская, В.А. Анисимова // Вестник ВолгГМУ. – 2014. –т. 51, №3. – С. 28-30.

33. Васильев, П.М. Применение компьютерной информационной технологии для прогноза фармакологической активности структурно разнородных химических соединений / П.М. Васильев, А.А. Спасов // Вестник ВолГМУ. - 2005. – Т. 13, № 1. - С.23-30.

34. Васильев, П.М. Языки фрагментарного кодирования структуры соединений для компьютерного прогноза биологической активности / П.М. Васильев, А.А. Спасов // Рос.хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). - 2006. - Т. 50, № 2. - С.108-127.

35. Ватолкина, О.Е. Влияние инказана и его производных на активность фосфодиэстеразы цикло-АМФ / О.Е. Ватолкина, Р.Е. Либинзон // Хим.-фарм. журн. – 1984. – № 2. – С. 152-153.

36. Ватолкина, О.Е. Ингибиторы фосфодиэстеразы цАМФ: анализ связи структура – активность: Дисс. ... канд. биол. наук / Ольга Евгеньевна Ватолкина. – Москва, 1992. - 154с.

37. Галенко-Ярошевский, А.П. Молекулярные механизмы вазоконстрикторного действия производного имидазо (1,2-альфа) бензимидазола РУ-1117, обладающего местными анестезирующими свойствами/А.П. Галенко-Ярошевский, А.С.Духанин, Х.П. Тахчиди, Б.Э. Малюгин //Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2007. - Т.143, №5. - С.531-535.

38. Галенко-Ярошевский, П.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств / П.А. Галенко-Ярошевский, Н.В.

Каверина, А.Г. Камкин [и др.] // В Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - С. 385-416.

39. Галенко-Ярошевский, П.А. Активность композиций фторсодержащего производного имидазобензимидазола РУ-1275 с ВИЗИТОНОМ-ПЭГ при терминальной анестезии / П.А. Галенко-Ярошевский, Н.П. Лисицына, Х.П. Тахчиди // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - № 1. - С. 23-26.

40. Галенко-Ярошевский, П.А. Производные бензимидазола: местноанестезирующие свойства, механизмы действия, перспективы использования в офтальмологии. /П.А. Галенко-Ярошевский, А.П. Галенко-Ярошевский, В.А. Анисимова, П.С. Чемоданова// под редакцией П.А. Галенко-Ярошевского. – Краснодар: Просвещение-Юг. – 2015. – 781 с. С илл.

41. Ганышина, Т.С. Влияние афобазола на кровоснабжение мозга в условиях модели геморрагического инсульта / Т.С. Ганышина, И.Н. Курдюмов, А.И. Турилова [и др.] // Экспер. и клин. фармакология. - 2009. - №6. - С. 18-21.

42. Генденштейн, Э.И. К фармакологии нового противоаритмического средства – аймалина / Э.И. Генденштейн, Я.И. Ходжай // Фармакол. и токсикология. – 1961. - Т. 24, № 1. – с. 49-57.

43. Гиляров, М.Ю. Кордарон: прошлое, настоящее и будущее / М.Ю. Гиляров, В.А. Сулимов // Клиническая фармакология и терапия. - 2006. - Т.15, №4. - С. 60-65.

44. Глотов, Н.В. Биометрия: Учеб.пособие / Н.В. Глотов, Л.А. Животовский, Н.В. Хованов, Н.Н. Хромов-Борисов // Под ред. М. М. Тихомировой. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. - 264 с.

45. Голендер, В. Е. Вычислительные методы конструирования лекарств / В.Е. Голендер, А.Б. Розенблит // Рига: Зинатне, 1978. - 238 с.

46. Голицин, С. Кордарон: широкий спектр антиаритмической и антифибрилляторной активности / С. Голицин // Врач. - 2003. - № 3. - С. 46.

47. Голицин, С.П. Амиодарон десятилетия спустя / С.П. Голицин // Тер. архив. - 2011. - № 8. - С. 25-33.

48. Горелик, А.Л. Методы распознавания / А.Л. Горелик, В.А. Скрипкин // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1984. - 208 с.

49. ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. - М.: Стандартиформ, 2010. - 62 с.
50. ГОСТ Р 50258-92 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. - М.: Издательство стандартов, 1992. - 7 с.
51. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. - 64 с.
52. Гречко, О.Ю. Изучение рецепторного механизма анальгетического действия соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, Д.М. Штарёва, А.И. Ращенко // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2014. –Т. 49, №1. - С. 61-63.
53. Гуревич, М.А. Негликозидная инотропные средства и нейрогуморальные антагонисты в лечении сердечности / М.А. Гуревич, Л.В. Архипова // Российский кардиологический журнал. - 2008. –Т. 73, № 5. - С. 84-87.
54. Гуревич, М.А. Современные аспекты фармакотерапии фибрилляции предсердий / М.А. Гуревич // Российский кардиологический журнал. - 2009. –Т. 79, № 5. - С. 95-101.
55. Дедов, И.И. Сахарный диабет: реперфузионные осложнения и проблемы кардиопротекции / И.И. Дедов, А.А. Александров // Consilium medicum. - 2006. - Т. 8, № 9. - С. 44-53.
56. Дощицин, В.Л. Влияние терапии антиаритмическими препаратами на качество жизни больных с экстрасистолией / В.Л. Дощицин, О.А. Крамышина, Е.В. Чернова [и др.] // Российский кардиологический журнал. - 2008. - Т. 73, № 5. - С. 46-52.
57. Зайдлер, Я.И. Поиск антиаритмических соединений на изолированном препарате предсердий крыс / Я.И. Зайдлер // Моделирование, методы изучения и экспериментальная терапия патологических состояний. - М.: Медицина, 1967. - Ч. 3. –С. 191.
58. Зверев, Я.Ф. Ингибирование  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена как новый подход к защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения / Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов // Обзоры по клинич. фармакол. и лек.терапии. - 2003. - Т. 2, №3. - С. 16-34.

59. Зефирова, О.Н. Медицинская химия (medicinal chemistry). II. Методологические основы создания лекарственных препаратов / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефиров // Вестн. Моск. ун-та. Сер. – 2000. – Т. 2. – С. 103-108.
60. Зефирова, О.Н. Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма / О.Н. Зефирова, Н.С. Зефиров // Вестник Московского Университета. СЕР. 2. ХИМИЯ. – 2002. – Т. 43., №4. – С. 251-256.
61. Иванов, С.В. Афобазол® в терапии тревожных расстройств в общей медицине / С.В. Иванов // Эффективная фармакотерапия. - 2010. - №16. - С. 12-15.
62. Каверина, Н.В. Итоги и перспективы поиска новых сердечно-сосудистых средств среди производных фенотиазина и других трициклических азотсодержащих систем / Н.В. Каверина, А.П. Сколдинов // Фармакология кардиотропных средств. Сборник трудов. Москва. - 1984. - С. 9-11.
63. Каверина, Н.В. Противofiбрилляторное действие антиаритмических средств различных классов в условиях активации парасимпатической нервной системы / Н.В. Каверина, Г.Г. Чичканов, И.Б. Цорин // Эксп. клин. фармакол. - 2004. –Т. 5, № 67. - С. 8-17.
64. Каверина, Н.В. Современные аспекты фармакологии антиангинальных средств / Н.В. Каверина, Ю.Б. Розонов, Г.Г. Чичканов. - М.: Медицина, 1980. - 240 с.
65. Казаченко, А.А. Сравнительная характеристика некоторых фармакологических моделей хронической сердечной недостаточности / А.А. Казаченко, С.В. Осковитый, А.Н. Кулико [и др.] // Экспер. и клин. фармакология. - 2008. - Т. 71, № 6. - С. 16-19.
66. Калитин, К. Поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных бензимидазола / К. Калитин // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград, сентябрь 2012). - 2012. - Т. Приложение, №б/н. - С. 179.

67. Канорский, С.Г. Новые международные рекомендации по лечению фибрилляции предсердий и желудочковых аритмий: подтверждение роли амиодарона / С.Г. Канорский // Клиническая фармакология и терапия. - 2007. - Т. 16, № 4. - С. 46-49.
68. Капелько, В.И. Комплексное исследование сердца крыс при поражении изопротеренолом / В.И. Капелько, В.Л. Лакомкин, Е.В. Лукошкова [и др.] // Кардиология. - 2014. - №3. - С. 46-56.
69. Капелько, В.И. Острое и пролонгированное действие адриамицина на сократительную функцию и антиоксидантный статус миокарда / В.И. Капелько, В.Л. Лакомкин, Г.Г. Коновалова [и др.] // Кардиология. - 2010. - Т. 50, № 12. - С. 45-51.
70. Карпов, Р.С. Высокотехнологичная медицинская помощь при аритмиях: стандарты и реальная практика / Р.С. Карпов, В.И. Перхов, И.В. Самородская // Бюллетень СО РАМН. - 2009. - Т. 135, №1. - С. 23-31.
71. Кириллов, О.В. Сравнительный анализ клинико-электрофизиологических эффектов ритмидазола, новокаиамида, кордарона и верапамила при суправентрикулярных тахиаритмиях: дис. ... канд. мед.наук / Кириллов Олег Владиславович. - Ростов на Дону, 1996. - 20 с.
72. Киселев, А.В. Влияние сочетания местнообезболивающего вещества РУ-1117 с ВИЗИТОНОМ-ПЭГ на ультраструктуру эндотелия роговицы при переднекамерной анестезии глаза / А.В. Киселев, П.А. Галенко-Ярошевский, С.Н. Сахнов [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2013.-Т. 48, № 4. - С. 39-43.
73. Ковалев, Г.В. Экспериментальное обоснование применения таурина и глутаминовой кислоты при сердечной недостаточности / Г.В. Ковалев, В.И. Петров, К.Г. Гурбанов [и др.] // В кн.: Фармакология кардиотонических средств. - М.: АМН СССР, 1988. - С. 106-110.
74. Колбин, А.С. Социально-экономическое бремя мерцательной аритмии в Российской Федерации / А.С. Колбин, Б.А. Татарский, И.Н. Бисерова [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. - 2010. -Т. 19, № 4. - С. 17-22.
75. Коллюцкая, Е.В. Терапия соматизированной тревоги: опыт применения препарата афобазол (обзор литературы) / Е.В. Коллюцкая // Психические расстройства в общей медицине. - 2013. - №2. - С. 22-25.

76. Косолапов, В.А. Антиоксидантные свойства производного пирролобензимидазола - соединения РУ-792 - в эксперименте / В.А. Косолапов, Л.В. Ельцова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2013. - Т. 155, № 4. - С. 453-456.
77. Крыжановский, С.А. К механизму противofiбрилляторного действия "афобазола" / С.А. Крыжановский, В.Н. Столярук, М.Б. Вититнова [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2010. - Т. 149, №3. - С. 290-293.
78. Крыжановский, С.А. Кардиопротективные эффекты афобазола у животных с хронической ишемией миокарда / С.А. Крыжановский, И.Б. Цорин, А.В. Сорокина [и др.] // Молекулярная медицина. - 2013. - №5. - С.37-42.
79. Крыжановский, С.А. Плейотропные (кардиотропные) эффекты анксиолитика афобазола (обзор экспериментальных исследований) / С.А. Крыжановский, В.Н. Столярук, М.Б. Вититнова [и др.] // Терапевт. - 2012. - №1. - С. 32-40.
80. Кузьмин, В.С. Ионные механизмы действия антиаритмических препаратов III класса / В.С. Кузьмин, Л.В. Розенштраух // Кардиология. - 2010. - №7. - С. 49-61.
81. Кулешова, С.А. Влияние верапамила, форилона и ритмидазола на кровоснабжение и некоторые показатели метаболизма головного мозга при его ишемии: дис. ... кан. фарм. наук / Кулешова Светлана Анатольевна. - Пятигорск, 1993. - 174 с.
82. Кучерявенко, А.Ф. Антиагрегантная активность нового производного бензимидазола / А.Ф. Кучерявенко, А.А. Спасов, В.И. Петров [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2013. - Т. 156, № 12. - С. 760-762.
83. Ларионов, Н.П. Отчет о проделанной работе по договору о научном сотрудничестве на 1987-1990 гг между Ростовским ордена Трудового Красного Знамени университетом им. А.М. Суслова, Волгоградским ордена Трудового Красного Знамени медицинским институтом и НИИ кардиологии ТНЦ АМН СССР. - Томск, 1988. - 8 с.
84. Лещанкина, Н.Ю. Исследование противоаритмической активности ритмидазола: дис. ... канд. мед.наук: / Лещанкина Нина Юрьевна. - Казань, 1996. - 16 с.
85. Лисицына, Н.П. Местно-анестезирующая активность сочетаний производного имидазобензимидазола РУ-1148 с ВИЗИТОНОМ-ПЭГ при обезболивании поверхностным

методом / Н.П. Лисицына, П.А. Галенко-Ярошевский, Х.П. Тахчиди // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009а. - № 2. - С. 91-94.

86. Лисицына, Н.П. Местно-анестезирующая активность сочетаний фторсодержащего производного имидазо[1,2-а]бензимидазола РУ-1274 с ВИЗИТОНОМ-ПЭГ в условиях терминального обезболивания / Н.П. Лисицына, П.А. Галенко-Ярошевский, Х.П. Тахчиди // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009б. - № 2. - С. 95-98.

87. Мазур, Н.А. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты: доказательства пользы и перспективы их применения / Н.А. Мазур // Кардиология. - 2012. - №4. - С. 80-84.

88. Мазур, Н.А. Сравнительная оценка эффективности лечения антиаритмическими препаратами / Н.А. Мазур // Тер.архив. - 1994. - Т. 66, № 12. - С. 3-6.

89. Майков, Е.Б. Отечественные антиаритмические препараты III класса: от эксперимента до клиники / Е.Б. Майков, С.Ф. Соколов, С.П. Голицин [и др.] // Кардиологический вестник. - 2010. - Т. 5, № 1. - С. 21-32.

90. Мандель, И.Д. Кластерный анализ / И.Д. Мандель // М.: Финансы и статистика. - 1988. - 176 с.

91. Мареев, В.Ю. Национальные рекомендации ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ХСН (четвертый пересмотр) / В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев, Г.П. Арутюнов [и др.] // Сердечная недостаточность. - 2013. - Т. 14, № 7. - с. 379-472.

92. Мареев, В.Ю. Сердечная недостаточность и желудочковые нарушения ритма сердца: проблемы лечения / В.Ю. Мареев // Кардиология. - 1996. - Т. 36, № 12. - С. 4-12.

93. Меерсон, Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон // Москва. - Медицина. - 1984. - 269 с.

94. Меркулов, Г.А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов // Л.: Медицина, 1969. - 424 с.

95. Метелица, В.И. Аритмогенное действие лекарственных средств / В.И. Метелица // Экспер. и клин. фармакология. - 2005. - Т. 68, №2. - С. 68-77.

96. Мирзоян, Р.С. Цереброваскулярная фармакология отдельной и сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганышина, Н.А. Хайлов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т. 77, №3. - С. 3-8.

97. Мирзоян, Р.С. Цереброваскулярные эффекты афобазола при сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганышина, Н.А. Хайлов // Экспер. и клин. фармакология. - 2010. - №5. - С. 2-7.
98. Михин, В.П. Роль кардиоцитопротекторов в терапии хронической сердечной недостаточности ишемического генеза / В.П. Михин, В.В. Савельева // Российский кардиологический журнал. - 2009. - Т. 75, №1. - С.49-56.
99. Моисеев1, В.С. Инотропные средства в лечении острой сердечной недостаточности при остром коронарном синдроме / В.С. Моисеев, И.А. Мерай // Клиническая фармакология и терапия. - 2013. - Т. 22, №4. - С. 18-22.
100. Моисеев1, В.С. Левосимендан или добутамин при острой сердечной недостаточности? / В.С. Моисеев, Е.П. Павликов // Клиническая фармакология и терапия. - 2009. - Т. 18, №4. - С. 14-17.
101. Моисеев1, В.С. Профилактика фибрилляции предсердий: постоянная антиаритмическая терапия или «таблетка в кармане»? / В.С. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. - 2008. - Т. 17, №4. - С. 10-14.
102. Моисеев2, С.В. N-3 полиненасыщенные жирные кислоты: о чем свидетельствуют результаты последних мета-анализов? / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. - 2011. - Т. 20, №1. - С. 30-35.
103. Моисеев2, С.В. Дисфункция щитовидной железы, вызванная амиодароном / С.В. Моисеев, Н.Ю. Свириденко // Клиническая фармакология и терапия. - 2012а. - Т. 21, №4. - С. 33-39.
104. Моисеев2, С.В. Кордарон или амиодарон в лечении и профилактике аритмий? / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. - 2010а. - Т. 19, №3. - С. 18-22.
105. Моисеев2, С.В. Лечение желудочковых аритмий и профилактика внезапной смерти: результаты рандомизированных клинических исследований амиодарона / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. - 2010б. - Т. 19, №4. - С. 43-48.
106. Моисеев2, С.В. Профилактика внезапной сердечной смерти: мета-анализ рандомизированных контролируемых исследований / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. - 2009. - Т. 18, №4. - С. 52-56.
107. Моисеев2, С.В. Фибрилляция предсердий: где проходит грань между



«чистыми» антиаритмиками и неантиаритмическими препаратами? / С.В. Моисеев // Кардиология. – 2012б. - №2. – С. 85-90.

108. Моисеев2, С.В. Что считать отправной точкой в лечении фибрилляции предсердий: антиаритмический эффект или улучшение прогноза? / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. – 2012в. – Т. 21, №1. – С. 35-40.

109. Моисеев2, С.В. Эволюция методов лечения желудочковых аритмий и профилактика внезапной сердечной смерти / С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. – 2012г. – Т. 21, №3. – С. 19-24.

110. Морозова, А.Ю. Оценка инфаркт-лимитирующего эффекта пре- и посткондиционирования с помощью определения уровня миокардиальных маркеров / А.Ю. Морозова, М.М. Галагудза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – Т. 20, №4. – С. 90-94.

111. Назипова, Д.А. Кардиопротективный эффект сукцината калия на модели изопротеренового инфаркта миокарда / Д.А. Назипова, О.Б. Ибрагимова, Н.Ш. Шамсутдинов [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 1998. – Т. 79, №3. – С. 212-213.

112. Нарыжная, Н.В. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца: основные проявления и молекулярный механизм / Н.В. Нарыжная, Л.Н. Маслов // Трансляционная медицина. – 2012. – Т. 5 – С. 56-67.

113. Наumenко, Л.В. Изменение электрокинетических свойств эритроцитов под воздействием пентоксифиллина и новых гемореологически активных соединений / Л.В. Наumenко, В.А. Кузнецова, А.А. Спасов [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2012а. – Т. 153, № 2. – С. 174-176.

114. Наumenко, Л.В. Фармакологические корректоры нарушений гемореологии и микроциркуляции: пути совершенствования поиска и изучение механизма действия: дис. ... док. мед. наук / Наumenко Людмила Владимировна. - Волгоград, 2012б. - 204 с.

115. Новиков, В.Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Экспер. и клин. фармакология. – 2013. – Т. 76, №5. – С. 37-47.

116. Оганов, Р.Г. Стратегии профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации./ Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Клиническая медицина. – 2012. – №3. – с. 4-7.
117. Островский, О.В. Лабораторные маркеры повреждения миокарда в современной кардиологии / О.В. Островский // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009а. - № 1. – С. 11-15.
118. Островский, О.В. Лабораторные маркеры повреждения миокарда в современной кардиологии / О.В. Островский // Лаборатория (спецвыпуск). – 2013. - №2. – С. 31-36.
119. Островский, О.В. Определение тропонина в диагностике острого инфаркта миокарда в практике: клинико-экономический анализ / О.В. Островский, М.Ф. Брезгина, В.Г. Зайцев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009б. - №7. – С. 7-9.
120. Отрохова, Е.В. Возможности патогенетического лечения больных ХСН с сохраненной систолической функцией левого желудочка / Е.В. Отрохова // Клиническая фармакология и терапия. – 2007. – Т. 16, №3. – С. 53-59.
121. Павликова, Е.П. Инотропная терапия при острой сердечной недостаточности: перспективы применения нового сенситизатора кальциевых каналов – левосимендан / Е.П. Павликова, Л.Г. Александрия, И.А. Мерай [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2005. – Т. 14, №3. – С.79-84.
122. Павликова, Е.П. Эффективность и безопасность инотропного препарата левосимендана у больных острым инфаркт миокарда с зубцом Q и острой сердечной недостаточностью / Е.П. Павликова, Д.Г. Рычков, А.Ф. Сафарова [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2006. – Т. 15, №4. – С. 39-43.
123. Панченко, Т.И. Противоаритмические свойства новых антиоксидантных веществ - конденсированных производных бензимидазола: дис. ... канд. мед. наук. / Панченко Татьяна Ивановна – Ростов-на-Дону, 1990. - 198 с.
124. Патент РФ RU 2290404. Соли 9-замещенных 2-галогенфенилимидазо[1,2-а]бензимидазолов и галогениды 1-замещенных 3-галогенфенацил-2-аминобензимидазолия, обладающие гемореологическими свойствами. / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов [и др.] // опубл. 26.12.2006. Бюл. изобретений. - 2006. - № 36. – 17 С.

125. Патент РФ RU 2391345. Дигидрохлорид 1-(3-морфолинопропил)-2-фенилимидазо[1,2-*a*]-бензимидазола, проявляющий свойства антагониста пуриновых P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-рецепторов, антиагрегантную и антитромботическую активность. / А.А. Спасов, В.И. Петров, В.А. Анисимова [и др.] // опубл 10.06.2010. Бюл. изобретений. - 2010. - № 16. – 10 С.
126. Патент РФ RU 2412187. Соли 9(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и соли 9-аминоэтилзамещённых 2-(4-фторфенил) имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, проявляющее обезболивающее действие. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, О.Ю. Гречко [и др.] // опубл. 20.02.2011. Бюл. Изобретений. - 2011. - № 5. - 13 с.
127. Патент РФ RU 2413512 Средство, обладающее каппа-опиоидной агонистической активностью. / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, П.М. Васильев и [и др.] // опубл. 10.03.2011. Бюл. Изобретений, - 2011. - №7. – 7 с.
128. Патент РФ RU 2440814 Средство, обладающее антитромбогенной активностью. Патент RUS 2440814 / А.А. Спасов, В.А. Анисимова, А.Ф. Кучерявенко, В.И. Минкин // опубл. 27.12.2012 Бюл. изобретений. - 2012. - № 3. – 7 С.
129. Патент РФ RU 2443704. Сульфаты 2-арил-4-диалкиламиноэтил-3-фенилпирроло[1,2-*a*]-бензимидазолов, обладающие антиоксидантными и антирадикальными свойствами. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов [и др.] // опубл. 27.02.12. Бюл. Изобретений. – 2012. - № 6. – 10 С.
130. Петров, В.И. Влияние сверхмалых доз антител к С-концевому фрагменту АТ<sub>1</sub>-рецептора ангиотензина II (кардоса) на течение хронической сердечной недостаточности: результаты первого клинического исследования / В.И. Петров, В.В. Иванченко, Н.А. Давыдова [и др.] // Сердечная недостаточность. – 2007. – Т. 8, №4. – С. 175 - 177.
131. Петров, В.И. Медицина, основанная на доказательствах: учебное пособие. // В.И. Петров, С.В. Недогода - М.: Гэотар-медиа. - 2012. - 144 с.
132. Петров, В.И. Разработка и клиническое исследование нового химического класса антиаритмических средств / В.И. Петров, А.А. Спасов, В.А. Анисимова, О.В. Кириллов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003. - №12. – С. 15-20.
133. Писаренко, О.И. Антиоксидантные свойства апелина-12 и его структурного аналога при экспериментальной ишемии и реперфузии сердца / О.И. Писаренко, Ж.Д. Беспалова, В.З. Ланкин [и др.] // Кардиология. – 2013. – Т. 53, №5. – С. 61-67.

134. Писаренко, О.И. Ингибиторы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена – новый класс кардиопротекторов / О.И. Писаренко // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, №9. – С. 1103-1110.
135. Писаренко, О.И. Ишемическое preconditioning: от теории к практике / О.И. Писаренко // Кардиология. – 2005. – Т. 45, №9. – С. 62-72.
136. Поротиков, В.И. Исследование механизма действия лекарственных веществ на полную проницаемость миокардиальных мембран: автореф. дис. ... док. биол. наук. / Поротиков Владимир Иванович – Купавна, 1982. – 28 с.
137. Поротиков, В.И. Особенности действия некоторых антиаритмических веществ на ионные токи в предсердии лягушки / В.И. Поротиков, М.Д. Машковский, К.А. Зайцева // Фармакология и токсикология (с 1992 г. Экспер. и клин. фармакология). – 1979. - №2. – С. 142-147.
138. Поротиков, В.И. Отчет об испытаниях новых синтетических производных имидазо(1,2- $\alpha$ )бензимидазола на трансмембранные ионные токи / В.И. Поротиков. – Купавна, 2008. – 4 с.
139. Постановление президиума РАМН. Развитие научных исследований и научной инфраструктуры в рамках задач платформы "Сердечно-сосудистые заболевания" / И.И. Дедов, В.А. Тутельян // Вестник РАМН. – 2012. – №3. – с.6-7.
140. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 N 18713). - 8 с.
141. Радзевич А.Э. Клиническая эффективность и фармакокинетика нового отечественного антиаритмического препарата нибентан / А.Э. Радзевич // Российский кардиологический журнал. – 2007. – Т. 5, №67. – С. 57-67.
142. Разумная, Ф.Г. Афобазол подавляет функциональную активность Т-лимфоцитов в системе *in vitro* / Ф.Г. Разумная, М.Х. Салимгареева, Р.С. Ямиданов [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2012. - №4. – С. 45-49.
143. Разумная, Ф.Г. К фармакологии афобазола / Ф.Г. Разумная, Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер, Н.А. Муфазалова // Фундаментальные исследования. - 2014. - №7. - с. 848-855.

144. Рамш, С.М. История создания отечественного лекарственного препарата дибазол / С.М. Рамш // Историко-биологические исследования. – 2011. – Т. 3, №4. – С. 36-59.
145. Распоряжение Правительства РФ от 19.12.2013 N 2427-р "Об установлении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2014 год" © КонсультантПлюс, 1992-2014: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_156084](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_156084)
146. Распоряжение Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. N 2199-р "Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2012 г." Система ГАРАНТ: <http://base.garant.ru/70105178/#ixzz34W2uvliF>.
147. Реутова, М.А. Анксиолитик афобазол® - субъективная оценка действия препарата больными с тревожно-астеническими расстройствами / М.А. Реутова, С.А. Сюняков, Т.С. Сюняков, Г.Г. Незнамов // Экспер. и клин. фармакология. – 2010. – Т. 73, №9. – С. 6-12.
148. Решетько, О.В. Инновационные лекарственные средства для лечения сердечной недостаточности: взгляд в будущее / О.В. Решетько // Качественная клиническая практика. – 2003. - №2 – С. 2-9.
149. Розенштраух, Л.В. Электрофизиологический анализ действия на миокард этмозина и диэтиламинового аналога этмозина, первых антиаритмических препаратов фенотиазинового ряда / Л.В. Розенштраух, Х.Х. Шугушев // Фармакология кардиотропных средств: – Москва, 1984. - С. 25-46.
150. Сажин, А.И. Кардиотропная активность синтетического пептида  $\text{CH}_3\text{CO-Lys-Lys-Arg-Arg-NH}_2$  (протектина) / А.И. Сажин // Экспер. и клин. фармакология. – 2010. – Т. 74, №6. – С. 14-19.
151. Самвелян, В.М. Противоаритмические свойства некоторых холинолитических средств / В.М. Самвелян, С.С. Василян // Кровообращение. - 1981. - Т. 14, № 6. - С. 13-18.
152. Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов, Л.В. Лысенко. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 1996.
153. Середенин, С.Б. Доказательство нейропротекторных свойств афобазола на экспериментальной модели фокальной ишемии головного мозга / С.Б. Середенин, О.В. Поварова, О.С. Медведев [и др.] // Экспер. и клин. фармакология. – 2006. – Т. 9, №4. – С. 3-5.

154. Середенин, С.Б. К механизму противоишемического действия препарата афобазол / С.Б. Середенин, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2013. – Т. 155, №6. – С. 723-727.
155. Середенин, С.Б. Нейропротекторные свойства афобазола при экспериментальном моделировании геморрагического инсульта / С.Б. Середенин, В.А. Крайнева // Экспер. и клин. фармакология. – 2009а. – Т. 72, №1. – С. 24-28.
156. Середенин, С.Б. Современная фармакотерапия эмоционально-стрессовых расстройств / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина // Вестник эстетической медицины. - 2009б. - Т. 8, № 3. - С. 32-40.
157. Сидоренко, Б.А. Меняющиеся взгляды на место лекарственных средств в лечении хронической сердечной недостаточности / Б.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Кардиология. – 2005. – №3. – С. 90.
158. Сидоренко, Б.А. Фармакотерапия гипертонической болезни / Б.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Русский медицинский журнал. - 1998. - Т. 6, № 19. - С. 1228.
159. Силкина, И.В. Влияние афобазона на содержание продуктов свободнорадикального окисления и активность каталазы в условиях ишемии головного мозга / И.В. Силкина, Т.А. Зенина, С.Б. Середенин, Р.С. Мирзоян // Экспер. и клин. фармакология. – 2006. – Т. 69, №4. – С. 47-50.
160. Симоненко, В.Б. Миокардиальные цитопротекторы резервный путь лечения больных со стабильной стенокардией напряжения / В.Б. Симоненко, О.С. Степанянц, А.Н. Тесля // Клиническая медицина. – 2011. – Т. 89, №4. – С. 34-36.
161. Скворцова, В.И. Анализ медико-организационных мероприятий по профилактике инсультов и реабилитации постинсультных состояний на современном этапе / В.И. Скворцова, Г.С. Алексеева, Н.Ю. Трифонова // Социальные аспекты здоровья населения. - 2013. - Т. 29, № 1. - С. 1-2.
162. Сонин, Д.Л. Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть I / Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский, В.А. Цырлин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. – Т. 32, №4. – С. 4-12.

163. Сонин, Д.Л. Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть II / Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский, В.А. Цырлин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 33, №1. – С. 4-12.
164. Спасов, А.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения РУ-891 / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, В.А. Анисимова // Экспер. и клин. фармакология. – 2014. – Т. 77, № 3. – С. 16-19.
165. Спасов, А.А. 5-НТ<sub>3</sub> – рецепторы – мишень для воздействия биологически активных соединений (обзор) / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев // Хим.-фарм. журнал. – 2013а. – Т. 47, №8. – С. 3-7.
166. Спасов, А.А. Р<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-рецепторы и их влияние на процессы агрегации тромбоцитов / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 43, №3. – С. 4-11.
167. Спасов, А.А. Р<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-рецепторы. Молекулярно-биологические, химические и фармакологические аспекты / А.А. Спасов // Saarbrücken: Deutschland. – 2013б. – 164 С.
168. Спасов, А.А. Анальгетические свойства производного морфолиноэтилимидазобензимидазола / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарёва, В.А. Анисимова // Экспер. и клин. фармакология. – 2013в. – Т. 76, № 9. – С. 15-18.
169. Спасов, А.А. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2006а. – Т. 40, № 11. – С. 23-26.
170. Спасов, А.А. Аритмогенный порог миокарда в условиях дефицита магния / А.А. Спасов, И.Н. Иежица, М.В. Харитонов, Н.А. Гурова // Бюлл. экп. биол. и мед. – 2008. – Т. 146, №7. – С. 69 – 71.
171. Спасов, А.А. Гистаминовые рецепторы: молекулярно-биологические и фармакологические аспекты / А.А. Спасов, М.В. Черников, П.М. Васильев [и др.] // Волгоградский государственный медицинский университет. – Волгоград, 2007. – 152 С.
172. Спасов, А.А. Диабенол - новое противодиабетическое вещество с гемобиологическими свойствами / А.А. Спасов, Г.П. Дудченко, Е.С. Гаврилова // Вестник ВолгГМУ. – 1997. – № 2. – С. 47.
173. Спасов, А.А. Имидазо[1,2-а] бензимидазолы – новый класс кардиотропных

средств: дис. ... док. мед. наук. / Спасов Александр Алексеевич. – Волгоград, 1984. – 464 с.

174. Спасов, А.А. Направленный поиск веществ с каппа-опиоидной агонистической активностью среди производных гетероциклических систем / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, П.М. Васильев [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2011. - № 8. - С. 52-55.

175. Спасов, А.А. Противоишемические свойства нового антиоксидантного средства эноксифола / А.А. Спасов, В.А. Косолапов, О.В. Островский // Экспер. и клин. фармакология. – 2003. -т.66, №4. – С. 17-20.

176. Спасов, А.А. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола / А.А. Спасов, И.Н. Иёжица, Л.И. Бугаева, В.А. Анисимова // Хим.-фарм. журнал. – 1999. – Т. 33, №5. – С. 6-17.

177. Спасов, А.А. Сравнительная оценка влияния стереоизомеров и рацемата карнитина на показатели кардио- и гемодинамики у крыс в условиях карнитиндефицитной диеты / А.А. Спасов, И.Н. Иежица, И.Н. Тюренков [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2006б. - №7. – С. 20 – 27.

178. Спасов, А.А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция активности. / А.А. Спасов, Н.А. Гурова, М.В. Харитоновна // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013г. – т. 76, №1. – с. 43-48.

179. Спасов, А.А. Фармакокинетика некоторых производных бензимидазола / А.А. Спасов, И.Н. Иёжица, Л. А. Смирнова [и др.] //Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48, №3. – С. 233-258.

180. Спасов, А.А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А. Спасов, В.И. Петров, Н.И. Чепляева [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013д. - № 2. - С. 43-49.

181. Столярук, В.Н. Изучение эффектов афобазола на модели реперфузионных аритмий / В.Н. Столярук, М.Б. Вититнова, С.А. Крыжановский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. - №4. – С. 41-45.

182. Сыренский, А.В. Влияние изменения метаболического и антиоксидантного статуса миокарда на выраженность его ишемического и реперфузионного повреждения /



А.В. Сыренский, М.М. Галагудза, Е.И. Егорова [и др.] // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2008. – Т. 94, №10. – С. 1171-1180.

183. Турилова, А.И. Антиаритмические свойства афобазола и других производных 2-меркаптобензимидазола / А.И. Турилова, Т.Я. Можаяева // Экспер. и клин. фармакология. – 2010. – Т. 73, №5. – С. 8-11.

184. Тюренков, И.Н. Влияние фенибута на кардио- и гемодинамику при острой ишемии миокарда / И.Н. Тюренков, К.Г. Гурбанов. / в сборнике: Достижения современной экспериментальной фармакологии сердечно-сосудистой системы. — 1981. — 50–66 с.

185. Тюренков, И.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. – М.: Гриф и К. – 2012. – с. 375-384.

186. Тюренков, И.Н. Применение нагрузки объемом для оценки функциональных резервов сердца / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // Экспер. и клин. фармакология. – 2005. – Т. 68, №4. – С. 60-62.

187. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XV.// под редакцией А.Г. Чучалина, В.В. Яснецова — М: "ЭХО", 2014. — 944 с.

188. Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Российский химический журнал. – 2006 – Т. 50, №2. – С. 66 - 75.

189. Фисенко, В.П. О побочных эффектах кордарона / В.П. Фисенко // Врач. – 2003. - №11. – С. 50-51.

190. Цорин, И.Б. О противоишемическом и антиаритмическом действии препарата эзофосфина / И.Б. Цорин, Г.Г. Чичканов // Экспер. и клин. фармакология. –2004. – Т. 67, №4. – С. 16-18.

191. Цорин, И.Б. Особенности действия селективного анксиолитика афобазола на сердечно-сосудистую систему / И.Б. Цорин, И.П. Палка, Г.Г. Чичканов // Экспер. и клин. фармакология. –2009. – Т. 72, №1. – С. 41-45.

192. Цыпленкова, В.Г. Гистологические и ультраструктурные характеристики миокарда при сердечной недостаточности / В.Г. Цыпленкова // Кардиология. – 2013. – Т. 53, №9. – С. 52-55.
193. Чазов, Е.И. Защитные системы организма как основа поиска и разработки новых оригинальных лекарственных средств./ Е.И. Чазов //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – №3. – с.6-7.
194. Черников, М.В. Анализ функционально значимых структурных фрагментов веществ с 5-НТ<sub>2</sub>- И 5-НТ<sub>3</sub>-антагонистической активностью / М.В.Черников, П.М. Васильев, А.А. Спасов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2013а. - № 3. - С. 38-41.
195. Черников, М.В. Р<sub>2</sub>Y-антагонистическая активность производных бензимидазола / М.В. Черников, А.А. Спасов// В книге: Р<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Рецепторы. Молекулярно-биологические, химические и фармакологические аспекты. под редакцией А.А. Спасова. - Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, Deutschland. – 2013б. - С. 33-58.
196. Чернов А.В. Антиаритмические свойства новых соединений - производных пиразоло-(1,5-а)-бензимидазола: дис. ... канд. мед. наук. / Александр Васильевич Чернов. –Ростов-на-Дону, 1990. – 159 с.
197. Чичканов, Г.Г. Методические рекомендации по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств / Г.Г. Чичканов, И.Б. Цорин // В Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - С. 417-434.
198. Чичканов, Г.Г. Антиаритмические свойства специфических брадикардических средств из группы производных 2-меркаптобензимидазола / Г.Г. Чичканов, И.Б. Цорин, Г.Ю. Кирсанова [и др.] // Экспер. и клин. фармакология. – 1997. – Т. 60, №5. – С. 35-39.
199. Шабашева И.Г. Антиаритмическое действие и фармакокинетика ритмидазола: дис. ... канд. мед. наук. / Ирина Германовна Шабашева. – Волгоград, 1997. – 21 с.
200. Шаваров, А.А. Фибрилляция предсердий и ассоциированные заболевания: подходы к лечению / А.А. Шаваров, А.С. Гончаров, А.А. Глобенко [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2011. - Т. 5, №20. – С. 86-90.

201. Шальнова С.А. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований) / С.А. Шальнова, А.Д. Деев // Терапевтический архив. – 2011. – Т. 83, №1. – С. 7-12.
202. Шальнова, С.А. Ишемическая болезнь сердца. Современная реальность по данным всемирного регистра CLARIFY./ С.А. Шальнова, Р.Г. Оганов, Ф.Г. Стэг, Й. Форд // Кардиология. – 2013. – №8. – с. 28-33.
203. Шилов, А.М. Хроническая сердечная недостаточность — особенности лечения / А.М. Шилов, М.С. Дулаева // Кардиология. – 2013. – Т. 51, №11. – С. 66-73.
204. Шляхто, Е.В. Метаболизм миокарда при хронической сердечной недостаточности и современные возможности метаболической терапии / Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза, Е.М. Нифонтов // Журнал сердечная недостаточность. – 2005. – Т. 6, №4. – С. 148-155.
205. Шляхто, Е.В. Национальные рекомендации по определению риска и профилактике внезапной сердечной смерти (сокращённая версия) / Е.В. Шляхто, Г.П. Арутюнов, Ю.Н. Беленков // Архив внутренней медицины. - 2013. - № 4. - С. 5-15.
206. Шляхто, Е.В. Сердечно-сосудистые заболевания в XXI веке: новые вызовы и новые решения. / Е.В. Шляхто // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – №3. – с. 13.
207. Шогенов, З.С. Фибрилляция предсердий: принципы лечения на основе доказательной медицины / З.С. Шогенов, Н.И. Гайдукова, Н.Г. Потешкина // Российский кардиологический журнал. – 2011. – Т. 91, №5. – С. 6-16.
208. Шубик, Ю.В. Кордарон в международных рекомендациях по лечению аритмий / Ю.В. Шубик // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т. 16, №21. – С. 1385-1390.
209. Abbs Fen Rej, T.F. 2-(2-Alkylamino-4-aminothiazoles): synthesis and the effect of intra molecular H-bonding in H1-NMR / T.F. Abbs Fen Rej, K.N. Rajasekharan // Indian J. Chem. - 2009. - №48B. - P. 823–828.
210. Achar, K.C. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives / K.C. Achar, K.M. Hosamani, H.R. Seetharamareddy // Eur. J. Med. Chem. - 2010. - Vol. 45, №5. - P. 2048–2054.

211. Adawa, A. Pharmacology of the bipyridines: amrinone and milrinone / A. Adawa, B. Johnson // *Circulation*. – 1986. – №73. – P. 10-24.
212. Ahmad1, S. Aminoimidazoles as bioisosteres of acylguanidines: novel, potent, selective and orally bioavailable inhibitors of the sodium hydrogen exchanger isoform-1 / S. Ahmad, K. Ngu, D. Combs [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2004. – T. 14. – №. 1. – C. 177-180.
213. Ahmad2, T. Charting a Roadmap for Heart Failure Biomarker Studies / T. Ahmad, M. Fiuzat, M.J. Pencina // *JACC Heart Fail.* - 2014. - Vol. 2, №5. - P. 477-488.
214. Alagoz, Z.A. Synthesis and antioxidant properties of novel tetrahydro-naphthalene fragments / Z.A. Alagoz, C. Kus, T. Coban // *J. Enzym Inhib. Med. Chem.* - 2004. - №20. - 325 P.
215. Allen, D.G. Role of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger during ischemia and reperfusion / D.G. Allen, X.H. Xiao // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 57, №4. – P. 934-41.
216. Alonso, F.P. Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives / F.P Alonso, H Cook, J.P Villanueva [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2009. - №44. - P. 1794–1800.
217. Ambrosio, G. Inotrope therapy in acute heart failure: a critical review of clinical and scientific evidence for levosimendan in the context of traditional treatment / G. Ambrosio, Di A. Lenarda, F. Fedele [et al.] // *G. Ital. Cardiol.* - 2009. - Vol. 10, №7. - P. 422-33.
218. Amrutkar, S.V. Synthesis and antifungal activity of 1-alkyl/H-2[4-(alkyl/aryl piperazin-1-yl)-methyl] benzimidazole derivatives / S.V. Amrutkar, U.D. Bhagat, P. Pargharmol [et al.] // *IJPPS*. - 2010. - Vol. 2, №2. - P. 84–92.
219. Anandarajagopal, K. 2-Mercaptobenzimidazole derivatives: synthesis and anticonvulsant activity / K. Anandarajagopal, R.N. Tiwari, K.G. Bothara [et al.] // *Adv. Appl. Sci. Res.* - 2010(a). - Vol. 1, №2. - P. 132–138.
220. Anandarajagopal, K. Synthesis anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of 2-mercaptobenzimidazole derivatives / K. Anandarajagopal, R.N. Tiwari, N. Venkateshan, P. Promwichit // *IJCAS*. - 2010(b). - Vol. 1, №9. - P. 214–216
221. Andreadou, I. Alternative Pharmacological Interventions that Limit Miocardial Infarction / I. Andreadou, E.K. Iliodromitis, M. Koufaki [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. - 2008. - №15. - P. 3204-3213.

222. Ansar, M. Synthesis, chemical and toxicological study of a new benzimidazol derivative / M. Ansar, A. Zellou, M.E. Faouzi [et al.] // *Annales pharmaceutiques francaises*. – 2009. – Vol. 67, №2. – P. 78-83.
223. Ansari, K.F. Synthesis and biological activity of some heterocyclic compounds containing benzimidazole and beta-lactam moiety / K.F. Ansari, C. Lal // *J. Chem. Sci.* - 2009(a). - Vol. 121, №6. P. 1017–1025.
224. Ansari, K.F. Synthesis and evaluation of some new benzimidazole derivatives as potential antimicrobial agents / K.F. Ansari, C. Lal // *Eur. J. Med. Chem.* - 2009(b). - №44. - P. 2294–2299.
225. Ansari, K.F. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives / K.F. Ansari, C. Lal // *Eur. J. Med. Chem.* - 2009(c). - №44. - P. 4028–4033.
226. Avkiran, M. Basic biology and pharmacology of the cardiac sarcolemmal sodium/hydrogen exchanger / M. Avkiran // *J. Card. Surg.* – 2003. - №18. Suppl. 1. – P. 3-12.
227. Baartscheer, A. Chronic inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger causes regression of hypertrophy, heart failure, and ionic and electrophysiological remodelling / A. Baartscheer, M. Hardziyenka, C.A. Schumacher [et al.] // *British journal of pharmacology*. – 2008. – Vol. 154, №6. – P. 1266-1275.
228. Babu, G.S. Synthesis, characterization and evaluation of novel N-(1H-benzimidazol-benzimidazoles containing substituted indole or 1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-2-yl)-2-isatinylidene-hydrazine-carboxamide derivatives as anti-inflammatory agents / G.S. Babu, N. Rajani, P.S. Malathy [et al.] // *Der Pharm. Chem.* - 2010. - Vol. 2, №3. - P. 196–204
229. Baher, A. Management of Ventricular Tachycardia in Heart Failure / A. Baher, M. Valderrabano // *Methodist De Bakey cardiovascular journal*. – 2013. – Vol. 9. – №1. – P. 20.
230. Bangash, M.N. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients / M.N. Bangash, M.L. Kong, R.M. Pearse // *British journal of pharmacology*. – 2012. – Vol. 165. – №7. – P. 2015-2033.
231. Bansal, Y. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review / Y. Bansal, O. Silakari // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – №21. – P. 6208-6236.

232. Bardy, G.H. Amiodarone or an implantable cardioverter.defibrillator for congestive heart failure. / G.H. Bardy, K.L. Lee, D.B. Mark [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2005. - Vol. 352. - №3. - P. 225-237.
233. Barekatin, A. Antiarrhythmic Therapy in Atrial Fibrillation: Indications, Guidelines, and Safety / A. Barekatin, M. Razavi // Texas Heart Institute Journal. – 2012. – Vol. 39. – №4. – P. 532-4.
234. Barnes, B.J. Drug-induced arrhythmias / B.J. Barnes, J.M. Hollands // Crit. Care Med. – 2010. -Vol. 38, (6 Suppl). – S. 188-197.
235. Barot, K.P. Novel research strategies of benzimidazole derivatives / K.P. Barot, S. Nikolova, I. Ivanov, M.D. Ghate // Mini Rev. Med. Chem. - 2013. - Vol. 13, №10. - P. 1421-47.
236. Baumgartner, M. Na(+)/H(+) exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes / M. Baumgartner, H. Patel, D.L. Barber // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2004. – Vol. 287, №4. – P. 844-50.
237. Baxton, R.S. Drugs wiht a class III antiarrhythmic action / R.S. Baxton, A.J. Camm // Pharmac. Ther. - 1982. - Vol. 17. - P. 315-355.
238. Beckers, J. Class 3 drugs: amiodarone / J. Beckers // Europ. Heart. J. - 1987. - Vol. 8, suppl. A. - P. 53-59.
239. Benito, B. Ventricular tachycardia in coronary artery disease / B. Benito, M.E. Josephson // Revista Espanola de Cardiologia (English Edition). – 2012. – Vol. 65. – №10. – P. 939-955.
240. Bondensgaard, K. Recognition of Privileged Structures by G-Protein Coupled Receptors / K. Bondensgaard, M. Ankersen, H. Thogersen [et al.] J Med Chem. - 2004. - Vol. 47, № 4. - P. 888-99.
241. Bontempo, L.J. Atrial fibrillation / L.J. Bontempo, E. Goralnick // Emerg. Med. Clin. N. Am. - 2011. - №29. - P. 747–758.
242. Boston, D. R. Effects of angiotensin II on intracellular calcium and contracture in metabolically inhibited cardiomyocytes / D.R. Boston, T. Koyama, J. Rodriguez-Larrain [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1998. – Vol. 285, №2. – P. 716-723.

243. Burashnikov, A. Atrial-selective sodium channel block for the treatment of atrial fibrillation / A. Burashnikov, C. Antzelevitch // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* – 2009. - Vol. 14, №2. – P. 233-249.
244. Burashnikov, A. Novel pharmacological targets for the rhythm control management of atrial fibrillation / A. Burashnikov, C. Antzelevitch // *Pharmacology & therapeutics.* – 2011. – Vol. 132, №3. – P. 300-313.
245. Burra, P. Liver abnormalities and endocrine diseases / P. Burra // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 27, №4. – P. 553-563.
246. Bywater, R.P. Privileged Structures in GPCRs / R.P. Bywater // *Ernst Schering Found Symp Proc.* - 2006. - № 2. - p. 75-91.
247. Carlsson, L. New pharmacological target and treatments for atrial fibrillation / L. Carlsson, G. Duker, I. Jacobson // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2010. - Vol. 31, №8. – P. 364-371.
248. Chang, W.L. 2-Phenyl-5-(pyrrolidin-1-yl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1H-benzimidazole, a benzimidazole derivative, inhibits growth of human prostate cancer cells by affecting tubulin and c-Jun N-terminal kinase / W.L. Chang, C.S. Chang, P.C. Chiang [et al.] // *British journal of pharmacology.* – 2010. – Vol. 160, №7. – P. 1677-1689.
249. Chatterjee, K. Role of nonglycosidic inotropic agents: indications, ethics, and limitations / K. Chatterjee, T. De Marco // *Med. Clin. Norts. Am.* – 2003. – №87. – P. 391-418.
250. Chemla, D. Mechanics of relaxation of the human heart / D. Chemla, C. Coirault, J.L. Hébert, Y. Lecarpentier // *News Physiol. Sci.* – 2000. – Vol. 15. – P. 78-83.
251. Chhonker, Y.S. Synthesis and pharmacological evaluation of some new 2-phenyl benzimidazole derivatives and their Schiff's bases / Y.S. Chhonker, B. Veenu, S.R. Hasim [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2009. - №6(S1). - P. 342–346.
252. Cingolani, H.E. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain / H.E. Cingolani, I.L. Ennis, E.A. Aiello, N.G. Perez // *Pflugers Arch.* – 2011. - Vol. 462, №1. – P. 29-38.
253. Cingolani, H.E. Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy / H.E. Cingolani, I.L. Ennis // *Circulation.* – 2007. – Vol. 115, №9. – P. 1090-1100.

254. Cingolani, H.E. Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle an autocrine-paracrine system / H.E. Cingolani, B.V. Alvarez, I.L. Ennis [et al.] // *Circulation research*. – 1998. – Vol. 83, №8. – S. 775-780.
255. Cong, C. Synthesis and antibacterial activity of novel 4-o-benzimidazolyl clarithromycin derivatives / C. Cong, H. Wang, Y. Hu [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2011. - Vol. 46, №7. - P. 3105–3111.
256. Coons, J.C. Pharmacotherapy for acute heart failure syndromes / J.C. Coons, M. McGraw, S. Murali // *American Journal of Health-System Pharmacy*. – 2011. – Vol. 68, №1. - P. 21-35.
257. Cuello, F. Evidence for direct regulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 phosphorylation and activity by 90-kDa ribosomal S6 kinase (RSK): effects of the novel and specific RSK inhibitor fmk on responses to alpha1-adrenergic stimulation / F. Cuello, A.K. Snabaitis, M.S. Cohen [et al.] // *Molecular pharmacology*. – 2007. – Vol. 71, №3. – P. 799-806.
258. Cui, J.J. Non-covalent thrombin inhibitors featuring P3-heterocycles with P1-Bicyclic arginine surrogates / J.J. Cui, G.L. Araldi, J.E. Reiner [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2002. - Vol. 12, №20. - P. 2925–2930.
259. Dang, Q. Fructose-1,6-bisphosphatase Inhibitors. 2. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a series of phosphonic acid containing benzimidazoles that function as 5'-adenosinemonophosphate (AMP) mimics / Q. Dang, S.R. Kasibhatla, W. Xiao [et al.] // *J. Med. Chem.* - 2010. - Vol. 53, №1. - P. 441-451.
260. Das, M. K. Antiarrhythmic and nonantiarrhythmic drugs for sudden cardiac death prevention / M.K. Das, D.P. Zipes // *Journal of cardiovascular pharmacology*. – 2010. – Vol. 55, №5. – P. 438-449.
261. Demirayak, S. Microwave supported synthesis of some novel 1,3-diarylpyrazino[1,2-*a*]benzimidazole derivatives and investigation of their anticancer activities / S. Demirayak, I. Kayagil, L. Yurtas // *Eur. J. Med. Chem.* - 2011. - Vol. 46, №1. - P. 411–416.
262. DeSimone, R.W. Privileged structures: applications in drug discovery / R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell [et al.] // *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. – 2004. – Vol. 7, №5. – P. 473-493.



263. Dettmann, S. 2-Phenyl-1-[4-(2-piperidine-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazoles as ligands for the estrogen receptor: synthesis and pharmacological evaluation / S. Dettmann, K. Szymanowicz, A. Wellmer, [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* - 2010. - Vol. 18, №14. - P. 4905–4916.
264. Ding, B. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis / B. Ding, J. Abe, H. Wei [et al.] // *Circulation.* - 2005. - Vol. 111, №19. - P. 2469–2476.
265. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010. Official Journal L 276, 20.10.2010 p. 33-79. (revising Directive 86/609/EEC)
266. Dobrev, D. New antiarrhythmic drug for treatment of atrial fibrillation. / D. Dobrev, S. Nattel // *New Drug Class.* – 2010. - Vol. 375, №9721. – P. 1212-1223.
267. Dobrev, D. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy / D. Dobrev, L. Carlsson, S. Nattel // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2012. – Vol. 11, №. 4. – P. 275-291.
268. Dorigo, P. Pharmacological characterization of a new Ca(2+) sensitizer / P. Dorigo, M. Floreani, G. Santostasi [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2000. - Vol. 295, №3. - P. 994-1004.
269. Eisa, H.M. Synthesis and antimicrobial activity of certain benzimidazole and fused benzimidazole derivatives / H.M. Eisa, A.M. Barghash, S.M. Badr, S.M. Farhat // *Indian J. Chem.* - 2010. - №45. - P. 1515–1525.
270. Endoh, M. Mechanisms of action of novel cardiotonic agents / M. Endoh // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 40, № 3. – P. 323-38.
271. Endoh, M. Acute heart failure: inotropic agents and their clinical uses / M. Endoh, M. Hori // *Department of Cardiovascular Pharmacology.* – 2006. – Vol. 7, №16. – P. 2179-2202.
272. Endoh, M. Cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> sensitizers / M. Endoh // *Circ. J.* – 2008. – Vol. 72, №12. – P. 1915-25.
273. Ennis, I.L. Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibition / I.L. Ennis, E.M. Escudero, G.M. Console [et al.] // *Hypertension.* – 2003. – Vol. 41, №6. – P. 1324-1329.
274. Estrada-Soto, S. Relaxant activity of 2-(substituted phenyl)-1H-benzimidazoles on isolated rat aortic rings: design and synthesis of 5-nitro derivatives / S. Estrada-Soto, R. Villalobos-Molina, F. Aguirre-Crespo [et al.] // *Life Sci.* - 2006. - Vol. 79, №5. - P. 430–435.

275. Ezekowitz, J.A. Novel pharmacologic therapies in development for acute decompensated heart failure / J.A. Ezekowitz // *Current cardiology reports*. – 2013. – Vol. 15, №2. – P. 1-8.
276. Farah, A.E. Historical perspectives on inotropic agents / A.E. Farah // *Circulation*. – 1986. – Vol. 73, №3(pt. 2). – P.1114-1119.
277. Fliegel, L. Elevated  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Expression and Its Role in Myocardial Disease / L. Fliegel // *Molecular Defects in Cardiovascular Disease: Dhalla N. S., Nagano M., Ošťádal B.* – Springer, 2011. - P. 43-53.
278. Fliegel, L. Molecular biology of the myocardial  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger / L. Fliegel // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2008. - Vol. 44, №2. – P. 228-237.
279. Fliegel, L. Regulation of the  $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$  exchanger in the healthy and diseased myocardium / L. Fliegel // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2009. - Vol. 13, №1. – P. 55-68.
280. Francis, G.S. Inotropes / G.S. Francis, J.A. Bartos, S. Adatya // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2014. - Vol. 63, №20. - P. 2069-2078.
281. Fuster, V. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation / V. Fuster, L.E. Rydén, D.S. Cannom [et al.] // *Eur. Heart J.* - 2006. - №27. - P. 1979–2030.
282. Gaba, M. Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents / M. Gaba, S. Singh, C. Mohan // *Eur. J. Med. Chem.* - 2014. - №76. - P. 494-505.
283. Gaba, M. Synthesis and pharmacological evaluation of novel 5-substituted-1-(phenylsulfonyl)-2-methylbenzimidazole derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents / M. Gaba, D. Singh, S. Singh [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2010. - Vol. 45, №6. - P. 2245–2249.
284. Galal, S.A. Synthesis and antitumor activity of novel benzimidazole-5-carboxylic acid derivatives and their transition metal complexes as topoisomerase II inhibitors / S.A. Galal, K.H. Hegab, A.M. Hashem, N.S. Youssef // *Eur. J. Med. Chem.* - 2010. - Vol. 45, №12. - P. 5685–5691.
285. Garcarena, C.D. Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart / C.D. Garcarena, C.I. Caldiz, E.L. Portiansky [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2009. - Vol. 106, №4. – P. 1325-31.

286. Garg, V. A New Approach to Inotropic Therapy in the Treatment of Heart Failure: Cardiac Myosin Activators in Treatment of HF / V. Garg, W.H. Frishman // *Cardiology in Review*. – 2013. – Vol. 21, №3. – P. 155-159.
287. Gill, C. Clubbed [1,2,3] triazoles by fluorinebenzimidazole: a novel approach to H37Rv inhibitors as a potential treatment for tuberculosis / C. Gill, G. Jadhav, M. Shaikh [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2008. - Vol. 18, №23. - P. 6244–6247.
288. Gordon, S.G. Pimobendan in Heart Failure Therapy - A Silver Bullet?. / S.G. Gordon, M.W. Miller, A.B. Saunders // *J. of the American Animal Hospital Association*. – 2006. –Vol. 42, №2. – P. 90-93.
289. Gramley, F. Recent advances in the pharmacological treatment of cardiac arrhythmias / F. Gramley, E. Himmrich, H. Mollnau [et al.] // *Drug of Today*. – 2009. - Vol. 45, №11. – P. 807-824.
290. Guo, X.Z. Synthesis and biological activities of novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonists based on benzimidazole derivatives bearing a heterocyclic ring / X.Z. Guo, L. Shi, R. Wang [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 16, №24. - P. 10301-10310.
291. Gupta, S.K. Synthesis and biological evaluation of some 2-substituted derivatives of benzimidazoles / S.K. Gupta, S.S. Pancholi, M.K. Gupta [et al.] // *J. Pharm. Sci. Res.* - 2010. - Vol. 2, №4. - P. 228–231.
292. Guthrie, R. Recent advances in cardiovascular risk reduction: implications of ONTARGET / R. Guthrie // *Clin. Cornerstone*. - 2009. - Vol. 9, Suppl. 3. - S. 18-26.
293. Guzman-Perez, A. Discovery of zoniporide: A potent and selective sodium–hydrogen exchanger type 1 (NHE-1) inhibitor with high aqueous solubility / A. Guzman-Perez, R.T. Wester, M.C. Allen [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2001. - Vol. 11, №6. – P. 803-807.
294. Han, C. An integrated drug-likeness study for bicyclic privileged structures: from physicochemical properties to in vitro ADME properties / C. Han, J. Zhang, M. Zheng [et al.] // *Mol. Divers.* - 2011. - Vol. 15, №4. - P. 857-876.
295. Harrison, D.S. Antiarrhythmic drugs classification: new science and practical applications / D.S. Harrison // *Amer. J. Cardiol.* - 1985. - Vol. 56, №1. - P. 185-187.

296. Hartupee, J. Positioning of inflammatory biomarkers in the heart failure landscape / J. Hartupee, D.L. Mann // *Journal of cardiovascular translational research*. – 2013. – Vol. 6, №4. – P. 485-492.
297. Hasenfuss, G. Cardiac inotropes: current agents and future directions / G. Hasenfuss, J.R. Teerlink // *European heart journal*. – 2011. – Vol. 32, №15. – P. 1838-1845.
298. Hashimoto, K. Na/H Exchange and Arrhythmia / K. Hashimoto, E. Nagasawa, B.M. Zhu // *Myocardial Ischemia and Preconditioning*: edited by Naranjan S. Dhalla, Nobuakira Takeda, Manjeet Singh, Anton Lukas. Kluwer Academic Publishers, - Boston, 2003. - P. 389–397.
299. Hayes, M.E. Discovery of small molecule benzimidazole antagonists of the chemokine receptor CXCR3 / M.E. Hayes, G.A. Wallace, P. Grongsaard [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2008. - Vol. 18, №5. - P. 1573–1576.
300. Haywood, G. Atrial fibrillation: relieving symptoms and managing risk / G. Haywood, E. Davies // *Clinical medicine*. – 2013. – Vol. 13, №6. – P. 607-609.
301. Heijman, J. New directions in antiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation / J. Heijman, N. Voigt, D. Dobrev // *Future cardiology*. – 2013. – Vol. 9, №1. – P. 71-88.
302. Herbst, L. Characterization of telmisartan-derived PPAR $\gamma$  agonists: importance of moiety shift from position 6 to 5 on potency, efficacy and cofactor recruitment / L. Herbst, M. Goebel, S. Bandholtz [et al.] // *ChemMedChem*. - 2012. - Vol. 7, №11. - P. 1935-1942.
303. Hohnloser, S.H. Benefit-Risk Assessment of Current Antiarrhythmic Drug Therapy of Atrial Fibrillation / S.H. Hohnloser // *Clinical cardiology*. – 2012. – Vol. 35, Suppl. 1. – P. 28-32.
304. Hohnloser, S.H. Drug treatment of atrial fibrillation: what have we learned? / S.H. Hohnloser, Y.G. Li // *Curr. Opin. Cardiol.* - 1997. - Vol. 12, №1. - P. 24-32.
305. Holdiness, A. Renin Angiotensin Aldosterone System Blockade: Little to No Rationale for ACE Inhibitor and ARB Combinations. / A. Holdiness, K. Monahan, D. Minor, R.D. de Shazo // *Am. J. Med.* – 2011. - Vol. 124, №1. - p. 15-9.
306. Hoogwerf, B.J. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. / B.J. Hoogwerf // *Am. J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 4, №105(1 Suppl). – p. 30A-5A.
307. Hori, M. The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in norepinephrine-induced protein synthesis in neonatal cultured rat cardiomyocytes / M. Hori, N. Nakatsubo, T. Kagiya [et al.] // *Japanese circulation journal*. – 1990. – Vol. 54, №5. – P. 535-539.

308. Horton, D.A. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures / D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe // *Chemical reviews*. – 2003. – Vol. 103, №3. – P. 893-930.
309. Hwu, J.R. Synthesis of new benzimidazole–coumarin conjugates as anti-hepatitis C virus agents / J.R. Hwu, R. Singha, S.C. Hong // *Antiviral research*. – 2008. – Vol. 77, №2. – P. 157-162.
310. Ibrar, A. Structurally diversified heterocycles and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a brief overview / A. Ibrar, I. Khan, N. Abbas // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. - 2013. - Vol. 346, №6. - P. 423-446.
311. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals // *Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation*. – Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago. - 1964. – C. 36-54.
312. Ishikawa, M. Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators / M. Ishikawa, K. Nonoshita, Y. Ogino [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2009. - Vol. 19, №15. - P. 4450-4454.
313. Ito, N. Endothelin and angiotensin II stimulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange is impaired in cardiac hypertrophy / N. Ito, Y. Kagaya, E.O. Weinberg [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1997. – Vol. 99, №1. – P. 125–35.
314. Jahangir, A. Aging and cardioprotection / A. Jahangir, S. Sagar, A.J. Terzic // *Appl. Physiol.* – 2007. - № 103. – p. 2120-2128.
315. Jain, Z.J. Action of benzimidazolo-piperazinyl derivatives on dopamine receptors / Z.J. Jain // *Medicinal Chemistry Research*. – 2013. – Vol. 22, №2. – P. 520-530.
316. Janssens U. Acute heart failure / U. Janssens // *Med. Klin. Intensivmed Notfmed*. - 2012. - Vol. 107, №5. – P. 397-423.
317. Jha, K.K. Microwave assisted synthesis, characterization & biological evaluation of benzimidazole substituted 1,3,4-oxadiazole / K.K. Jha, Y. Kumar, M. Shaharyar, S. Singhal // *Int. J. Chem. Tech. Res.* – 2010. - Vol.2, №1. – p. 716–727.
318. Jordan, A.D. Potential anxiolytic agents. Part 4: novel orally-active N5-substituted pyrido[1,2-*a*]benzimidazoles with high GABA-A receptor affinity / A.D. Jordan, A.H. Vidya, D. I. Rosenthal [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2002. - №12. – P. 2381–2386.

319. Kamal, A. Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the quinoxaline, quinazoline and benzimidazole based privileged structures / A. Kamal, K.L. Reddy, V. Devaiah [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* - 2006. - Vol. 6, №1. - P. 71-89.
320. Kamal, A. Synthesis of new benzimidazole linked pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepine conjugates with efficient DNA-binding affinity and potent cytotoxicity / A. Kamal, P.P. Kumar, K.S. Sreekanth [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2008. - №18. - P. 2594-2598.
321. Kappenberger, L. A new look at atrial fibrillation: lessons learned from drugs, pacing, and ablation therapies / L. Kappenberger // *European heart journal.* - 2013. - Vol. 34, №35. - P. 2739-2745.
322. Karmazyn, M. Antiarrhythmic effects of Na-H exchange inhibition / M. Karmazyn // *Drug Development Research.* - 2002. - Vol. 55, №1. - p. 22-28.
323. Karmazyn, M. NHE-1: still a viable therapeutic target / M. Karmazyn // *Journal of molecular and cellular cardiology.* - 2013. - Vol. 61. - P. 77-82.
324. Karmazyn, M. The myocardial  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange structure, regulation, and its role in heart disease / M. Karmazyn, X.T. Gan, R.A. Humphreys [et al.] // *Circulation research.* - 1999. - Vol. 85, №. 9. - P. 777-786.
325. Karmazyn, M. The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodeling / M. Karmazyn, A. Kilic, S. Javadov // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2008. - № 44. - p. 647-653.
326. Katz, A.M. Heart Failure. Pathophysiology, molecular biology, and clinical management / A.M. Katz // Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. - 2000.
327. Kaur<sup>1</sup>, G. Benzimidazoles: An Ideal Privileged Drug Scaffold for the Design of Multitargeted Anti-inflammatory Ligands / G. Kaur, M. Kaur, O. Silakari // *Mini Rev. Med. Chem.* - 2014. - Vol. 14. №9. - P. 747-767.
328. Kaur<sup>2</sup>, N. Design, synthesis, and evaluation of 5-sulfamoyl benzimidazole derivatives as novel angiotensin II receptor antagonists / N. Kaur, A. Kaur, Y. Bansal [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 16, №24. - P.10210-5.
329. Kazimierczuk, Z. Synthesis, antiprotozoal and antibacterial activity of nitro- and halogeno-substituted benzimidazole derivatives / Z. Kazimierczuk, J.A. Upcroft, P. Upcroft [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* - 2002. - Vol.49, №1. - P. 185-195

330. Keri, R.S. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole - Based Medicinal Chemistry / R.S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi, B.M. Nagaraja // Chem. Biol. Drug Des. - 2014.
331. Khandoudi, N. Role of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in mediating the effects of endothelin-1 on the normal and ischemic and reperfused heart / N. Khandoudi, J. Ho, M. Karmazyn // Circ Res. - 1994. - Vol. 75. - P. 369–78.
332. Kilcigil, G.A. Synthesis and antifungal properties of some benzimidazole derivatives / G.A. Kilcigil, N. Altanlar // Turk. J. Chem. – 2006. - №30. – P. 223–228
333. Kim, J. Privileged Structures: Efficient Chemical "Navigators" toward Unexplored Biologically Relevant Chemical Spaces / J. Kim, H. Kim, S.B. Park // J. Am. Chem. Soc. - 2014. - Vol. 136, №42. - P. 14629-14638.
334. Kincaid, R.L. Calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase from brain. Changes in molecular size assessed by gel filtration and electrophoresis / R.L. Kincaid, V.C. Manganiello, M. Vaughan // J. Biol. Chem. – 1981. – V. 256, №21. – P. 11345 - 11350.
335. Knight, W. Therapeutic potential of PDE modulation in treating heart disease./ W. Knight, C. Yan // Future medicinal chemistry. - 2013. - № 5(14). -p. 1607-1620.
336. Kobayashi, Y. Clinical characteristics and management of proarrhythmias during antiarrhythmic therapy / Y. Kobayashi // Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine. – 2013. – Vol. 71, №1. – P. 79-85.
337. Koliakos, G. NHE-1: a molecular target for signalling and cell matrix interactions / G. Koliakos, K. Paletas, M. Kaloyianni // Connect .Tissue Res. – 2008. – Vol. 49, № 3. – p. 157-61
338. Kumar, K. Antiarrhythmic Drugs 2013: State of the Art / K. Kumar, P.J. Zimetbaum // Current cardiology reports. – 2013. – Vol. 15, №10. – P. 1-8.
339. Kus, C.S. Synthesis and antioxidant properties of novel N-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amine and 4-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thionederivatives of benzimidazole class / C.S. Kus, G. Ayhan-Kileigil, S. Ozbey [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2008. - №16. – p. 4294–4303.
340. Kusumoto, K. In vitro and in vivo pharmacology of a structurally novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger inhibitor, T-162559 / K. Kusumoto, H. Igata, A. Abe [et al.] // British Journal of Pharmacology. - 2002. - №135. – p.1995-2003.

341. Lal, S. 2-Arylindoles: a privileged molecular scaffold with potent, broad-ranging pharmacological activity / S. Lal, T.J. Snape // *Curr. Med. Chem.* - 2012. - Vol. 19, №28. - P. 4828-4837.
342. Lavrador-Erb, K. The discovery and structure-activity relationships of 2-(piperidin-3-yl)-1H-benzimidazoles as selective, CNS penetrating H1-antihistamines for insomnia / K. Lavrador-Erb, S.B. Ravula, J. Yu [et al.] // *Bioorganic medicinal chemistry letters*. – 2010. – Vol. 20, №9. – P. 2916-2919.
343. Lazzara, R. Antiarrhythmic drugs and torsade de pointes/ R. Lazzara // *Eur. Heart J.* - 1993. - Vol. 14, H. - P. 88-92.
344. Leonard, J.T. Synthesis, anti-inflammatory and antibacterial activities of 4-substituted phenyl benzimidazoles / J.T. Leonard, L. Jeyaseeli, M. Kumar, R. Sivakumar // *Asian J. Chem.* – 2006. - №18. – p. 1104
345. Lewis, R.J. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 9th ed. Volumes 1-3 / R.J. Lewis // New York, NY: Van Nostrand Reinhold. - 1996. - p. 1148.
346. Liu1, S.S. Frontiers of therapy for patients with heart failure / S.S. Liu, J. Monti, H. M. Kargbo // *The American journal of medicine*. – 2013. – Vol. 126, №1. – P. 6-12.
347. Liu2, W. Benzimidazolones: a new class of selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) modulators / W. Liu, F. Lau, K. Liu [et al.] // *J. Med. Chem.* - 2011. - Vol. 54, №24. - P. 8541-8554.
348. Lopez-Rodriguez, M.L. Benzimidazole derivatives. Part 5: design and synthesis of new benzimidazole-arylpiperazine derivatives acting as mixed 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>3</sub> ligands / M.L. Lopez-Rodriguez, B. Benhamu, M.J. Morcillo [et al.] // *Bioorg Med Chem.* - 2004. - V. 12, №19. - p. 5181-91.
349. Luo1, J. Physiology and pathophysiology of Na(+)/H(+) exchange isoform 1 in the central nervous system / J. Luo, D. Sun // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2007. – Vol. 4, № 3. – p. 205-15.
350. Luo2, Y. Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of some thiazolylbenzimidazole derivatives / Y. Luo, F. Xiao, S. Quan [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. - №46. – p. 417–422.
351. Macintyre, C.J. Catheter ablation for ventricular tachycardia in structural heart disease / C.J. Macintyre, J.L. Sapp // *Can. J. Cardiol.* - 2014. – Vol. 30, №2. - p. 244-246.



352. Madonna, R Sodium-hydrogen exchangers (NHE) in human cardiovascular diseases:interfering strategies and their therapeutic applications. / R. Madonna, R. De Caterina // *Vascul. Pharmacol.* - 2013. - Vol. 59, №5-6. - p. 127-30.
353. Malo, M.E. Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger / M. E. Malo, L. Fliegel // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 84, № 11. – p. 1081-95.
354. Mann, D.L. Getting pumped about heart failure / D.L. Mann // *Cell. Metab.* - 2014. - Vol.19, №6. - p. 896-7.
355. Mann, D.L. Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease: Expert Consult / D.L. Mann // Elsevier Health Sciences. - 2010.
356. Mann, D.L. Myocardial recovery and the failing heart: myth, magic, or molecular target? / D.L. Mann, P.M. Barger, D. Burkhoff // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2012. – Vol. 60, №24. – P. 2465-2472.
357. Mariappan, G. Synthesis and biological evaluation of Mannich bases of benzimidazole derivatives / G. Mariappan, N.R. Bhuyan, P. Kumar [et al.] // *Indian J. Chem.* – 2011. - №50B. – p. 1216–1219
358. Masereel, B. An overview of inhibitors of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger / B. Masereel, L. Pochet, D. Laeckmann // *Eur. J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 38, №6. – p. 547-54.
359. Mattiazi, A. Dissociation between positive inotropic and alkalinizing effects of angiotensin II in feline myocardium / A. Mattiazi, N.G. Perez, M.G. Vila-Petrof // *Am. J. Physiol.* - 1997. - Vol. 272. p. H1131–6.
360. Maurice, D.H. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases./ DH Maurice, H Ke, F Ahmad [et al.] // *Nature reviews Drug discovery.* - 2014. -№13(4). - p. 290-314.
361. Mavrova, A.T. Synthesis, antitrichinnellosis and antiprotozoal activity of some novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones containing benzimidazole ring / A.T. Mavrova, D. Vuchev, K. Anichina, N. Vassilev // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. - №45. - P. 5856–5861.
362. McCann, P. Inotropic therapy: an important role in the treatment of advanced symptomatic heart failure / P. McCann, P. J. Hauptman // *Medical Clinics of North America.* – 2012. – Vol. 96, №. 5. – P. 943-954.

363. McKinsey, T.A. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes / T.A. McKinsey, E.N. Olson // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – Vol. 115, №3. – P. 538-546.
364. Mehdizadeh, R. Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats / R. Mehdizadeh, M.R. Parizadeh, A.R. Khooei [et al.] // *Iranian journal of basic medical sciences*. – 2013. – Vol. 16, №. 1. – P. 56-63.
365. Meinerzt, T. Change in therapy of cardiac arrhythmias. Current studies-initial results / T. Meinerzt // *Med. Klin.* - 1997. - Vol. 92, № 4. - P. 211-4.
366. Metra, M. Old and new intravenous inotropic agents in the treatment of advanced heart failure / M. Metra, L. Bettari, V. Carubelli, L.D. Cas // *Progress in cardiovascular diseases*. – 2011a. – Vol. 54, №2. – P. 97-106.
367. Metra, M. Use of inotropic agents in patients with advanced heart failure: lessons from recent trials and hopes for new agents / M. Metra, L. Bettari, V. Carubelli [et al.] // *Drugs*. - 2011b. - Vol. 71, №5. - P. 515-25.
368. Miller, J.E. Novel N-substituted benzimidazole CXCR4 antagonists as potential anti-HIV agents / J.E. Miller, E.M. Turner, A.S. Gudmundsson [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. - №20. – P. 2125–2128.
369. Mizuno, C.S. Design, synthesis, and docking studies of novel benzimidazoles for the treatment of metabolic syndrome / C.S. Mizuno, A.G. Chittiboyina, F.H. Shah [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, №3. – P. 1076-85.
370. Mohamed, B.G. Synthesis of 1-acyl-2-alkylthio-1,2,4-triazolobenzimidazoles with antifungal, anti-inflammatory and analgesic effects / B.G. Mohamed, M. Abdel-Alim, M.A. Hussein // *Acta Pharm.* – 2006. - №56. - P. 31–48.
371. *Molecular Similarity in Drug Design/* Ed.: P.M. Dean. – London: Blackie Academic & Professional, 1995. – 342 p.
372. Moor, A.N. Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium / A.N. Moor, X.T. Gan, M. Karmazyn, L. Fliegel // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276. - P. 16113–22.

373. Moor, A.N. Protein kinase-mediated regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways / A.N. Moor, L. Fliegel // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, №33. – P. 22985-22992.
374. Mor, M. Synthesis, biological activity, QSAR and QSPR study of 2-aminobenzimidazole derivatives as potent H<sub>3</sub>-antagonists / M. Mor, F. Bordi, C. Silva [et al.] // *Bioorg Med Chem*. – 2004. - V. 12, №4. - p. 663-74.
375. Morita, H. Genetic causes of human heart failure / H. Morita, J. Seidman, C. E. Seidman // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – Vol. 115, №3. – P. 518-526.
376. Movsesian, M. Phosphodiesterase inhibition in heart failure / M. Movsesian, J. Stehlik, F. Vandeput, M.R. Bristow // *Heart failure reviews*. – 2009. – Vol. 14, №4. – P. 255-263.
377. Nakano, H. Synthesis of benzimidazole derivatives as antiallergic agents with 5-lipoxygenase inhibiting action / H. Nakano, T. Inoue, N. Kawasaki // *Chem. Pharm. Bull.* – 1999. – Vol. 47, № 11. – p. 1573–1578.
378. Nanda, S. Atrial Fibrillation – Advances in Drug Therapy / S. Nanda, S.M. Siddique, M.W. Martinez [et al.] // *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 11-19.
379. Narasimhan, B. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety / B. Narasimhan, D.Sharma, P. Kumar // *Medicinal Chemistry Research*. – 2012. – Vol. 21, №3. – P. 269-283.
380. Navarrete-Vazquez, G. Synthesis, vasorelaxant activity and antihypertensive effect of benzo[d]imidazole derivatives / G. Navarrete-Vazquez // *Bioorganic and medicinal chemistry*. – 2010. – Vol. 18, №11. – P. 3985-3991.
381. Ng, R.A. 2-(2,2,2-Trifluoroethyl)-5,6-dichlorobenzimidazole derivatives as potent androgen receptor antagonists / R.A. Ng, J. Guan, V.C. Alford [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2007a. - №17. – P. 955–958.
382. Ng, R.A. Synthesis of potent and tissue-selective androgen receptor modulators (SARMs): 2-(2,2,2)-trifluoroethyl-benzimidazole scaffold / R.A. Ng, J.C. Lanter, V.C. Alford // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2007b. - №17. – P. 1784–1787.

383. Nijjer, S.S. Management of supraventricular tachycardias / S.S. Nijjer, S.M. Afzal Sohaib, Z.I. Whinnett, D.C. Lefroy // *British Journal of Hospital Medicine*. – 2014. – Vol. 75, №2. – P. 26-28.
384. Nofal, Z.M. Novel benzimidazole derivatives as expected anticancer agents / Z.M. Nofal, E.A. Soliman, S.S. Abd El-Karim [et al.] // *Acta poloniae pharmaceutica*. – 2011. – Vol. 68, №4. – P. 519-534.
385. Noolvi, M. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activity of novel azetidine-2-one derivatives of 1H-benzimidazole / M. Noolvi, S. Agrawal, H. Patel [et al.] // *Arabian J. Chem.* - 2014. - Vol. 7, №2. - P. 219–226.
386. Ong, M.E.H. The use of antiarrhythmic drugs for adult cardiac arrest: a systematic review / M.E.H. Ong, T. Pellis, M.S. Link // *Resuscitation*. – 2011. – Vol. 82, №6. – P. 665-670.
387. Orlowski, J.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. /J. Orlowski , S. Grinstein // *Compr Physiol*. - 2011. - 1(4). - p. 2083-100.
388. Osadchii, O. Rat strain-related differences in myocardial adrenergic tone and the impact on cardiac fibrosis, adrenergic responsiveness and myocardial structure and function / O. Osadchii, G. Norton, D. Deftereos, A. Woodiwiss // *Pharmacological research*. – 2007a. – Vol. 55, №4. – P. 287-294.
389. Osadchii, O.E. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects / O.E. Osadchii // *Heart Fail. Rev.* - 2007b. - № 12. - P. 66-86.
390. Osadchii, O.E. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease / O.E. Osadchii // *Cardiovascular drugs and therapy*. – 2007c. – Vol. 21, №3. – P. 171-194.
391. Padilla, D.V. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives / D.V. Padilla, S.R. Morales, A.H. Campos [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. - №17. – P. 1724–1730.
392. Palin, R. Synthesis and evaluation of N-3 substituted phenoxypropyl piperidine benzimidazol-2-one analogues as NOP receptor agonists with analgesic and sedative properties / R. Palin, A. Bom, J.K. Clark [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2007. – Vol. 15, №4. – P. 1828-1847.

393. Parissis, J.T. Inotropes in cardiac patients: update 2011 / J.T. Parissis, P. Rafouli-Stergiou, V. Stasinos [et al.] // *Current opinion in critical care*. – 2010. – Vol. 16, №5. – P. 432-441.
394. Patel, C. Atrial Fibrillation: Pharmacological Therapy / C. Patel, M. Salahuddin, A. Jones [et al.] // *Curr. Probl. Cardiol.* – 2011. – Vol. 36, №3. – P. 87-120.
395. Perrone, S.V. Calcium sensitizer agents: A new class of inotropic agents in the treatment of decompensated heart failure / S.V. Perrone, C. Patel // *International J. of Cardiology*. - 2005. – №3. – P. 248-255.
396. Pettersen, J.C. Neurotoxic effects of zoniporide: a selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 / J.C. Pettersen, L. Chouinard, R.L. Kerlin [et al.] // *Toxicol. Pathol.* - 2008. – Vol. 36, № 4. - P. 608-619.
397. Pinnell, J. Cardiac muscle physiology // J. Pinnell, S. Turner, S. Howell [et al.] // *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. – 2007. – Vol. 7, №3. – P. 85-88.
398. Polanski, J. Privileged structures - dream or reality: preferential organization of azanaphthalene scaffold / J. Polanski, A. Kurczyk, A. Bak, R. Musiol // *Curr. Med. Chem.* - 2012. - Vol. 19, №13. - P. 1921-1945.
399. Puceat, M. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart / M. Puceat, G. Vassort // *Cardiovasc. Res.* - 1995. - Vol. 29, № 2. - P. 178–183.
400. Rajanarendra, E. Synthesis and in vitro study of novel isoxazolyl benzimidazolyl benzamides, acrylamides and propionamides as antimicrobial agent / E. Rajanarendra, K. Ramu, A.S.R. Reddy, F.P. Shaik // *Indian J. Chem.* – 2010. - №47B. – P. 1281–1290.
401. Rao, Y.J. Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts / Y.J. Rao, L. Xi // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2009. - №1. – P. 1-24.
402. Ravens, U. Antiarrhythmic therapy in atrial fibrillation / U. Ravens // *Pharmacol. Ther.* – 2010. – Vol. 128, №1. – p. 129-145.
403. Reddy, B.A. Synthesis, characterization and biological evaluation of 1,2-disubstituted benzimidazole derivatives using Mannich bases / B.A. Reddy // *E. – J. Chem.* – 2010. – Vol. 7, №1. – p. 222–226.

404. Reinhart, K. Beyond the Guidelines: New and Novel Agents for the Prevention of Atrial Fibrillation After Cardiothoracic Surgery / K. Reinhart, W.L. Baker, M. Lea-Wah Siv // J. Cardovasc. Pharmacol. Ther. – 2011. – Vol. 16, №1. – p. 5-13.
405. Rivara, M. Synthesis and biological evaluation of new non-imidazole H<sub>3</sub>-receptor antagonists of the 2-aminobenzimidazole series / M. Rivara, V. Zuliani, G. Cocconcelli [et al.] // Bioorg Med Chem. – 2006. - Vol. 14, №5. - p. 1413-24.
406. Rognoni, A. Levosimendan: from basic science to clinical trials / A. Rognoni, A. Lupi, M. Lazzerio [et al.] // Recent patents on cardiovascular drug discovery. – 2011. – Vol. 6, №1. – P. 9-15.
407. Roskopf, D. Rapid determination of the elevated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay / D. Roskopf, E. Morgenstern, W. Scholz [et al.] // Journal of Hypertension. – 1991. - № 9. – P.231-238.
408. Ruskin, J.N. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) investigators. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia supression after miocardial infarction / J.N. Ruskin // N. Engl. J. Med. - 1989. - Vol. 321. - P. 406-412.
409. Safonov, I.G. New benzimidazoles as thrombopoietin receptor agonists / I.G. Safonov, D.A. Heerding, R.M. Keenan [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2006. - №16. – P. 1212–1216.
410. Sambanthamoorthy, K. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner / K. Sambanthamoorthy, A.A. Gokhale, W. Lao [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, №9. – P. 4369-4378.
411. Santangeli, P. Examining the safety of amiodarone / P. Santangeli, L. Di Biase, J.D. Burkhardt [et al.] // Expert opinion on drug safety. – 2012. – Vol. 11, №2. – P. 191-214.
412. Savelieva, I. Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drug, investigational agents, and innovative approaches / I. Savelieva, J. Camm // Europace. – 2008. – № 10. – p. 647-665.
413. Schelling, J.R. Regulation of cell survival by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 / J.R. Schelling, B.G.A. Jawdeh // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2008. – Vol. 295, №. 3. – P. 625-632.

414. Scheuer, J. Catecholamines in cardiac hypertrophy / J. Scheuer //The American journal of cardiology. – 1999. – Vol. 83, №. 12. – P. 70-74.
415. Schluter, K.D. Influence of pHi and creatine phosphate on alpha-adrenoceptor-mediated cardiac hypertrophy / K.D Schluter, M. Schafer, C. Balser [et al.] // Journal of molecular and cellular cardiology. – 1998. – Vol. 30, №. 4. – P. 763-771.
416. Selvam, P. Synthesis of novel 2-substituted benzimidazole derivatives as potential antimicrobial agents / P. Selvam, P.P. Radhika, S. Janagaraj, A.S. Kumar // Res. Biotechnol.- 2011. - Vol.2, №3. - P. 50–57.
417. Shah1, D.I. Angiotensin II-AT1 receptor antagonists: design, synthesis and evaluation of substituted carboxamidobenzimidazole derivatives / D.I. Shah, M. Sharma, Y. Bansal [et al.] //European Journal of Medicinal Chemistry. - 2008. - Vol.43, №9. - P. 1808-12.
418. Shah2, K. Benzimidazole: a promising pharmacophore / K. Shah, S. Chhabra, K. Sushant [et al.] // Medicinal Chemistry Research. – 2013. – Vol. 22, №. 11. – P. 5077-5104.
419. Shah2, K.S. Novel Biomarkers in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction / K.S. Shah, A.S. Maisel // Heart failure clinics. – 2014. – Vol. 10, №. 3. – P. 471-479.
420. Shah3, N.R. Serum biomarkers in severe refractory cardiogenic shock / N.R. Shah, M.C. Bieniarz, S.S. Basra [et al.] // JACC: Heart Failure. – 2013. – Vol. 1, №. 3. – P. 200-206.
421. Shaharyar, M. Synthesis, characterization and pharmacological screening of novel benzimidazole derivatives. / M. Shaharyar, A. Mazumdar, R. Garg [et al.] // Arabian Journal of Chemistry. -2011. - P. 1-6.
422. Shanmugapandiyan, P. Synthesis and biological activity of 2-(thiazolidin-4-one) phenyl]-1H-phenylbenzimidazoles and 2-[4-(azetidin-2-one)-3-chloro-4-phenyl]-1H-phenyl benzimidazoles / P. Shanmugapandiyan, K.S. Denshing, R. Ilavarasan [et al.] // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. – 2010. – Vol. 2, №2. - P. 115–119.
423. Sharma1, M.C. An efficient synthesis and evaluation of some new benzimidazoles derivatives [2-substituted)-amino]-phenyl}-1-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-1H benzoimidazol-5-ylamine as potential antihypertensive agents. / M.C Sharma, D.V. Kohli, S. Sharma // Drug Invent Today. - 2010a. – Vol. 2, №6. – P. 275–281
424. Sharma1, M.C. Synthesis and antihypertensive activity of some new benzimidazole derivatives of 40 -(6-methoxy-2-substituted-benzimidazole-1-ylmethyl)- biphenyl-2-carboxylic acid

in the presences of  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ . / M.C. Sharma, D.V. Kohli, S. Sharma, A. D. Sharma // *Pel. Res. Lib.* - 2010b. – Vol. 1, №1. – P. 104–115.

425. Sharma<sup>1</sup>, M.C. Synthesis and biological evaluation of potent antihypertensive activity: 2-[(substituted phenyl amino)-phenyl-methyl]-1-[20-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-3-ylmethyl]-1H-benzimidazol-5-yl amine derivatives / M.C. Sharma, D.V. Kohli, S. Sharma // *IJAPS.*- 2010c. - Vol. 1. – P. 284–298.

426. Sharma<sup>1</sup>, M.C. Synthesis and pharmacological evaluation of 40 -[2-(phenyl-substituted amino-methyl)-benzimidazol-1-ylmethyl] with biphenyl carboxylic acid derivatives as potent antihypertensive agents. / M.C. Sharma, D.V. Kohli, S. Sharma // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* - 2010d. - Vol. 2, №4. – P. 2467–2481

427. Sharma<sup>2</sup>, S.M. Design; synthesis and pharmacological investigation of some benzimidazole derivatives 40-(5,6-substituted-2-trifluoromethyl-benzimidazole-1-yl-methyl)-biphenyl-2-carboxylic acid as potent antihypertensive agents. / S.M. Sharma, M.C. Sharma, D.V. Kohli // *J.Optoelectr. Biomed. Mater.* – 2010. – Vol. 2, №4. – P. 1573–1578

428. Sheng, C. Design and synthesis of antifungal benzoheterocyclic derivatives by scaffold hopping / C. Sheng, X. Che, W. Wang [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry.* - 2011. - Vol. 46. - P. 1706–1712.

429. Shibata, M. NHE-1 participates in isoproterenol-induced downregulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts / M. Shibata, D. Takeshita, K. Obata [et al.] // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* – 2011. – Vol. 301, № 5. – P. 2154-2160.

430. Shingalapur, R.V. Derivatives of benzimidazolepharmacophore: synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies / R.V. Shingalapur, K.V. Hosamani, R.S. Keri, M.H. Hugar // *European Journal of Medicinal Chemistry.* - 2010. - Vol. 45.- P. 1753–1759.

431. Shingalapur, R.V. Synthesis and evaluation of in vitro anti-microbial and anti-tubercular activity of 2-styryl benzimidazoles / R.V. Shingalapur, K.M. Hosamani, R.S. Keri // *European Journal of Medicinal Chemistry.*- 2009.- Vol. 44. – P.4244–4248.

432. Siczkowski, M. Phorbol ester activation of the rat vascular myocyte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform 1 / M. Siczkowski, L.L. Ng // *Hypertension.* – 1996. – Vol. 27, №. 4. – P. 859-866.



433. Siddiqui, N. Anticonvulsant and toxicity evaluation of newer 1-[(1-(2-substituted benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl]-3-arylthioureas / N. Siddiqui, M.S. Alam // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2010. – Vol. 2, №2. – P.163–171
434. Singh1, B.N. Antiarrhythmic actions of amiodarone: a profile of a paradoxical agent / B.N. Singh // *American Journal of Cardiology*- 1996a. - Vol. 78. - P. 41-53.
435. Singh1, B.N. Expanding indications for the use of Class III agents in patients at high risk for sudden death / B.N. Singh // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 1995. - Vol. 6, № 10. - Pt. 2. - P. 887-900.
436. Singh1, B.N. Newer agents for maintaining sinus rhythm in atrial fibrillation: simplicity or complexity / B.N. Singh, E. Aliot // *European Heart Journal Supplements*. – 2007. - № 9. – P. 17-25.
437. Singh1, B.N. The coming of age of the class III antiarrhythmic principle: retrospective and future trends / B.N. Singh // *American Journal of Cardiology*. - 1996b. - Vol. 78. - P. 17-27.
438. Singh1, B.N. When is QT prolongation antiarrhythmic and when is proarrhythmic? / B.N. Singh // *American Journal of Cardiology*. - 1988. - Vol. 63. - P. 867-868.
439. Singh2, J. Recent advances in pharmacotherapy of atrial fibrillation / J. Singh, J.S. Braich, J. Indian // *Pharmacol.* – 2009. -Vol. 4, №41. – P. 153-157.
440. Singh2, J. Synthesis, anticonvulsant activity and comparative QSAR study of some novel 1,2,5-trisubstituted benzimidazole derivatives / J. Singh, P. Grover, D.P. Pathak // *Acta. Pharm. Sci.* - 2010. - Vol. 52. – P.511–522.
441. Singh3, V.P. Synthesis of new thiazolidinylbenzimidazole and azetidiniylbenzimidazole derivatives / V.P. Singh, A. Kumar, S.K. Bhati, A. Kumar // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* - 2011.- Vol. 3, №1. - P.563–570.
442. Skanes, A.C. What have clinical trials taught us about proarrhythmia? / A.C. Skanes, M.S. Green // *Can. J. Cardiol.* - 1996. - Vol. 12, Suppl B. - P. 20B-26B.
443. Slepko, E.R. Structural and functional analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger / E.R. Slepko, J.K. Rainey, B.D. Sykes, L. Fliegel // *Biochem. J.* – 2007. – Vol. 401, №3. – P. 623–633.
444. Song, Y. "Old friends in new guise": exploiting privileged structures for scaffold re-evolution/refining / Y. Song, W. Chen, D. Kang [et al.] // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* - 2014. - Vol. 17, №6. - P. 536-553.

445. Stock, C. Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration / C. Stock, A. Schwab // *Acta. Physiol. (Oxf)*. – 2006. - № 187(1-2). – P. 149-57.
446. Szabo, M. Structure-activity relationships of privileged structures lead to the discovery of novel biased ligands at the dopamine D<sub>2</sub> receptor / M. Szabo, C. Klein Herenbrink, A. Christopoulos [et al.] // *J. Med. Chem.* - 2014. - Vol. 57, №11. - P. 4924-4939.
447. Takaki, M. Cardiac mechanoenergetics for understanding isoproterenol-induced rat heart failure / M. Takaki // *Pathophysiology*. – 2012. – Vol. 19, №3. – P. 163-170.
448. Tallant, M.D. Synthesis and evaluation of 2-phenyl-1,4-butanediamine-based CCR5 antagonists for the treatment of HIV-1 / M.D. Tallant, M. Duan, G.A. Freeman [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. - Vol. 21. - P. 1394–1398.
449. Tamargo, J. Investigational positive inotropic agents for acute heart failure / J. Tamargo // *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*. – 2009. – Vol. 9, №. 3. – P. 193-205.
450. Tamargo, J. New therapeutic targets for the development of positive inotropic agents / J. Tamargo // *Discovery medicine*. – 2011. – Vol. 12, №. 66. – P. 381-392.
451. Tanged, S.T. Synthesis of new pyrrolo[2,3- d]pyrimidine derivatives and evaluation of their activities against human colon cancer cell lines / S.T. Tanged, A. Garlapati // *Eur. J. Med. Chem.*- 2010.- Vol. 45.- P. 1453–1458.
452. Teerlink, J.R. Agents with inotropic properties for the management of acute heart failure syndromes. Traditional agents and beyond / J.R. Teerlink // *Heart. Fail. Rev.* – 2009a. - Vol. 14, №4. - P. 243-53.
453. Teerlink, J.R. A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators / J.R. Teerlink // *Heart. Fail. Rev.* – 2009b. – Vol. 14, №4. - P. 289-98.
454. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators. Effect of the antiarrhythmic agent moricizine on survival after myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* - 1992. - № 327. - P. 227-233.
455. The CASCADE investigators. Randomized antiarrhythmic drug therapy in survivors of cardiac arrest (the CASCADE study) // *Am. J. Cardiol.* - 1993. - Vol. 72. - P. 280-287.
456. Thihalolipavan, S. Atrial Fibrillation and Congestive Heart Failure / S. Thihalolipavan, D.P. Morin // *Heart failure clinics*. – 2014. – Vol. 10, №2. – P. 305-318.

457. Thomson Reuters Integrity: Официальный сайт [Электронный ресурс]. URL: <http://integrity.thomson-pharma.com> (дата обращения 01.05.2011).
458. Tracey, W.R. Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1) / W.R. Tracey, M.C. Allen, D.E. Frazier [et al.] // *Cardiovasc. Drug Rev.* - 2003. - №21. - P. 17-32
459. Trochu, J.N. [Experience and prospects in the treatment of heart failure] / J.N. Trochu, J.P. Gueffet // *Therapie.* – 2009. – Vol. 64, №2. – P. 75-80.
460. Varsha, P. Synthesis and biological activity of sum 2-substituted benzimidazole / P. Varsha, M. Danish, B. Anroop // *J. Sci. Tharm.* – 2004. Vol. 51. – P. 117–120.
461. Vaughan-Williams, E.M. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drug / E.M. Vaughan-Williams // *J. Clin. Pharmacol.* - 1984. - Vol. 24. - P. 129-147.
462. Vaughan-Williams, E.M. *Antiarrhythmic Drugs* / E.M. Vaughan-Williams // Springer-Verlag, Berlin. - 1989. – P. 650.
463. Velik, J. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes / J. Velik, V. Baliharova, J. Fink-Gremmels [et al.] // *Research in veterinary science.* – 2004. – T. 76., №2. – C. 95-108.
464. Venkataramana, H.C. Synthesis of phenyl hydrazine substituted benzimidazole derivatives and their biological activity / H.C. Venkataramana, A. Singh, A. Tiwari, V. Tiwari // *I. J. SPR.* – 2009. Vol. 1, №1. - P. 34–38.
465. Verma, A. Nitrogen containing privileged structures and their solid phase combinatorial synthesis / A. Verma, M.R. Yadav, R. Giridhar [et al.] // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* - 2013. - Vol. 16, №5. - P. 345-393.
466. Vinodkumar, R. Synthesis, anti-bacterial, anti-asthmatic and anti-diabetic activities of novel N-substituted-2-(4-phenylethynyl-phenyl)-1H-benzimidazoles and N-substituted 2[4-(4,4-dimethyl-thiochroman-6-yl-ethynyl)-phenyl]-1H-benzimidazoles / R. Vinodkumar, S.D. Vaidya, B.V. Siva Kumar [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 43, №5. - P. 986-95.
467. Vrana, M. Class I and III antiarrhythmic drugs for prevention of sudden cardiac death and management of postmyocardial infarction arrhythmias. A review / M. Vranaa, J. Pokornyb, P. Marcianc, Z. Fejfar // *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc.* – 2013. – Vol. 157, №. 2. - p. 114-24.

468. Vyas, V.K. Substituted benzimidazole derivatives as angiotensin II-AT1 receptor antagonist: a review / V.K. Vyas, M. Ghate // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2010. – Vol. 10, №. 14. – P. 1366-1384.
469. Wachter, R. Diagnosis of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction / R. Wachter, F. Edelmann // *Heart Fail Clin*. - 2014. - Vol. 10, №3. - P. 399-406.
470. Wakabayashi, S. Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in health and disease / S. Wakabayashi, T. Hisamitsu, T.Y. Nakamura // *J. Mol. Cell. Cardiol*. - 2013. - Vol. 61. - P. 68-76.
471. Wakabayashi, S. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls “H<sup>+</sup> sensing” / S. Wakabayashi, P. Fafoumoux, C. Sardet, J. Pouyssegur // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1992. - Vol. 89, № 6. - P. 2424–8.
472. Wallert, M.A. 1-Adrenergic stimulation of the Na–H exchange in cardiac myocytes / M.A. Wallert, O. Frohlich // *Am. J. Physiol*. - 1992. - Vol. 263. - P. 1096–102.
473. Wang, H. Phosphorylation and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger through mitogen-activated protein kinase / H. Wang, N.L. Silva, P.A. Lucchesi [et al.] // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, №. 30. – P. 9151-9158.
474. Wu, M.L. The modulatory effects of endothelin-1, carbachol and isoprenaline upon Na<sup>+</sup>–H<sup>+</sup> exchange in dog cardiac Purkinje fibers / M.L. Wu, Y.Z. Tseng // *J. Physiol* . - 1993. - Vol. 471. - P. 583–97.
475. Xue, F. Inhibitory properties of 2-substituent-1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives against enteroviruses / F. Xue, X. Luo, C. Ye [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. – 2011. – Vol. 19. – P. 2641–2649.
476. Yamazaki, T. Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy / T. Yamazaki, I. Komuro, S. Kudoh [et al.] // *Circulation research*. – 1998. – Vol. 82, №. 4. – P. 430-437.
477. Yokoyama, H.  $\alpha_1$ -Adrenergic Stimulation of Sarcolemmal Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger Activity in Rat Ventricular Myocytes Evidence for Selective Mediation by the  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptor Subtype / H. Yokoyama, M. Yasutake, M. Avkiran // *Circulation research*. – 1998. – Vol. 82. №. 10. – P. 1078-1085.
478. Zhang, R. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury /

R. Zhang, L. Lei, Y. Xu [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2007. – Vol. 17, №. 9. – P. 2430-2433.

479. Zimetbaum, P. Antiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation / P. Zimetbaum // Circulation. – 2012. – Vol. 125, №. 2. – P. 381-389.

480. Zorniak, M. [Derivatives of 1,4-dihydropyridines as "privileged structures" and their pharmacological potential] / M. Zorniak, K. Mitrega, T.F. Krzeminski // Kardiologia Polska. - 2011. - Vol. 69, Suppl 3. - P. 100-103.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

Влияние конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола на рефрактерность<sup>1</sup> миокарда (продолжительность эффективного рефрактерного периода) изолированных предсердий крыс *in vitro*, активность ФДЭ<sup>2</sup> кардиомиоцитов и NHE<sup>3</sup> тромбоцитов *in vitro*

№	Шифр	Молекулярная масса	Брутто формула	Влияние на эффективный рефрактерный период, МЭК, М	Ингибирование ФДЭ кардиомиоцитов в концентрации $1 \times 10^{-4}$ М, %	Ингибирование NHE тромбоцитов кролика в концентрации $1 \times 10^{-8}$ М, %
1.	РУ-4	305,2	$C_{13}H_{22}Cl_2N_4$	$1,30 \times 10^{-3}$	-	-
2.	РУ-8	245,7	$C_{13}H_{12}ClN_3$	$4,50 \times 10^{-4}$	-	-
3.	РУ-13	405,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4$	$3,60 \times 10^{-5}$	-	<b><math>58,87 \pm 4,40</math></b>
4.	РУ-17	417,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4$	$1,30 \times 10^{-4}$	0	<b><math>27,84 \pm 18,50</math></b>
5.	РУ-18	343,2	$C_{16}H_{24}Cl_2N_4$	<b><math>5,00 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
6.	РУ-20	279,7	$C_{13}H_{14}ClN_3O_2$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
7.	РУ-22	401,3	$C_{18}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$2,09 \times 10^{-4}$	-	-
8.	РУ-23	263,7	$C_{13}H_{14}ClN_3O$	$4,20 \times 10^{-4}$	-	-
9.	РУ-24	447,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O$	$3,70 \times 10^{-5}$	-	-
10.	РУ-26	341,2	$C_{16}H_{22}Cl_2N_4$	<b><math>5,50 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
11.	РУ-28	192,6	$C_{10}H_9ClN_2$	$1,10 \times 10^{-3}$	-	-
12.	РУ-29	273,7	$C_{15}H_{16}ClN_3$	$2,06 \times 10^{-4}$	-	-
13.	РУ-31	453,4	$C_{22}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$1,20 \times 10^{-4}$	-	-
14.	РУ-32	455,4	$C_{25}H_{28}Cl_2N_4$	$4,30 \times 10^{-4}$	-	-
15.	РУ-35	484,2	$C_{21}H_{25}BrCl_2N_4$	$3,40 \times 10^{-4}$	-	<b><math>&lt; 6,03 \pm 3,44</math></b>
16.	РУ-36	385,3	$C_{19}H_{30}Cl_2N_4$	$4,30 \times 10^{-5}$	-	<b><math>&lt; 48,53 \pm 20,17</math></b>
17.	РУ-42	312,7	$C_{17}H_{17}ClN_4$	$8,40 \times 10^{-4}$	-	-
18.	РУ-45	666,3	$C_{27}H_{32}I_2N_4$	$1,70 \times 10^{-4}$	-	-
19.	РУ-46	616,3	$C_{23}H_{30}I_2N_4$	$1,80 \times 10^{-4}$	-	-
20.	РУ-49	322,7	$C_{15}H_{19}ClN_4O_2$	$4,30 \times 10^{-4}$	-	-

<sup>1</sup> - Часть данных о влиянии на возбудимость (эффективный рефрактерный период изолированных предсердий крыс) являются собственными исследованиями автора (выделены **курсивом**), остальные выполнены в рамках докторской диссертации А.А. Спасова (1984) и использованы для проведения ретроспективного анализа высокого уровня антиаритмической активности.

<sup>22</sup> - Абсолютные данные антифосфодиэстеразной активности, представленные в отчете Ларионова, Червякова (1988), переведены в форму "% эффективности".

<sup>3</sup> - Данные об **NHE ингибирующей активности** являются собственными исследованиями автора.

21.	PY-50	511,4	$C_{28}H_{32}Cl_2N_4O$	$5,40 \times 10^{-4}$	-	-
22.	PY-51	465,9	$C_{29}H_{24}ClN_3O$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
23.	PY-53	433,9	$C_{25}H_{24}ClN_3O_2$	$6,45 \times 10^{-4}$	-	-
24.	PY-55	403,9	$C_{24}H_{22}ClN_3O$	$6,90 \times 10^{-4}$	-	-
25.	PY-62	419,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4$	$4,00 \times 10^{-5}$	-	-
26.	PY-63	494,2	$C_{21}H_{26}Br_2N_4$	$4,50 \times 10^{-5}$	0	-
27.	PY-64	458,4	$C_{21}H_{26}N_6O_6$	$4,90 \times 10^{-5}$	-	<b>&lt;22,45±12,88</b>
28.	PY-65	430,5	$C_{21}H_{26}N_4O_4S$	$5,30 \times 10^{-5}$	-	-
29.	PY-66	496,2	$C_{22}H_{25}BrCl_2N_4$	$2,80 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;38,49±10,29</b>
30.	PY-67	447,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O$	$7,30 \times 10^{-4}$	-	<b>49,03±7,56</b>
31.	PY-68	467,4	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4$	$1,20 \times 10^{-3}$	-	-
32.	PY-69	427,3	$C_{20}H_{28}Cl_2N_4O_2$	$6,50 \times 10^{-5}$	-	-
33.	PY-71	210,7	$C_{11}H_{15}ClN_2$	$2,40 \times 10^{-4}$	-	-
34.	PY-72	501,4	$C_{24}H_{29}BrN_4O_3$	$2,20 \times 10^{-4}$	-	-
35.	PY-73	385,3	$C_{18}H_{26}Cl_2N_4O$	$1,40 \times 10^{-4}$	-	-
36.	PY-74	459,4	$C_{24}H_{28}Cl_2N_4O$	$6,10 \times 10^{-5}$	-	-
37.	PY-75	538,3	$C_{24}H_{27}BrCl_2N_4O$	$5,20 \times 10^{-4}$	-	-
38.	PY-76	567,9	$C_{28}H_{28}BrClN_4O_2$	$5,01 \times 10^{-4}$	-	-
39.	PY-77	489,0	$C_{28}H_{29}ClN_4O_2$	$5,75 \times 10^{-4}$	-	-
40.	PY-78	505,8	$C_{23}H_{26}BrClN_4O_2$	$5,62 \times 10^{-4}$	-	-
41.	PY-79	579,9	$C_{29}H_{28}BrClN_4O_2$	$9,77 \times 10^{-4}$	-	-
42.	PY-80	501,0	$C_{29}H_{29}ClN_4O_2$	$5,62 \times 10^{-4}$	-	-
43.	PY-81	579,9	$C_{29}H_{28}BrClN_4O_2$	$4,57 \times 10^{-4}$	-	-
44.	PY-83	490,6	$C_{18}H_{25}Cl_5N_4O$	$5,75 \times 10^{-4}$	-	-
45.	PY-84	564,7	$C_{24}H_{27}Cl_5N_4O$	$5,01 \times 10^{-4}$	-	-
46.	PY-85	510,2	$C_{21}H_{26}Br_2N_4O$	$2,10 \times 10^{-4}$	-	-
47.	PY-87	433,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O$	$5,80 \times 10^{-4}$	-	<b>29,46±12,71</b>
48.	PY-88	497,4	$C_{27}H_{30}Cl_2N_4O$	$2,20 \times 10^{-4}$	-	-
49.	PY-89	570,3	$C_{23}H_{30}Br_2N_4O_3$	$1,90 \times 10^{-4}$	-	-
50.	PY-90	614,3	$C_{28}H_{30}Br_2N_4O_2$	$4,57 \times 10^{-4}$	-	-
51.	PY-94	366,8	$C_{18}H_{27}ClN_4O_2$	$7,50 \times 10^{-4}$	-	-
52.	PY-96	221,6	$C_{11}H_{12}ClN_3$	$6,90 \times 10^{-4}$	-	-
53.	PY-97	243,2	$C_{12}H_{13}N_5O$	$1,17 \times 10^{-3}$	-	-
54.	PY-99	265,7	$C_{13}H_{16}ClN_3O$	$1,05 \times 10^{-3}$	-	-
55.	PY-100	449,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4O$	$2,70 \times 10^{-4}$	-	-
56.	PY-101	435,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4O$	$6,40 \times 10^{-4}$	-	-
57.	PY-102	529,5	$C_{28}H_{34}Cl_2N_4O_2$	$4,70 \times 10^{-4}$	-	-
58.	PY-117	293,7	$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	$9,50 \times 10^{-4}$	-	-
59.	PY-118	369,8	$C_{20}H_{20}ClN_3O_2$	$7,20 \times 10^{-4}$	-	-
60.	PY-120	421,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O$	$7,30 \times 10^{-5}$	-	-



61.	PY-122	490,3	$C_{22}H_{27}IN_4O$	$5,75 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;45,74±13,48</b>
62.	PY-124	474,2	$C_{19}H_{30}Br_2N_4$	$3,55 \times 10^{-5}$	-	-
63.	PY-125	438,4	$C_{19}H_{30}N_6O_6$	$3,80 \times 10^{-5}$	-	-
64.	PY-126	397,3	$C_{20}H_{30}Cl_2N_4$	$4,20 \times 10^{-5}$	-	-
65.	PY-127	486,2	$C_{20}H_{30}Br_2N_4$	$3,50 \times 10^{-5}$	-	-
66.	PY-133	318,3	$C_{19}H_{18}N_4O$	$8,91 \times 10^{-4}$	-	-
67.	PY-134	454,3	$C_{20}H_{31}IN_4$	$6,17 \times 10^{-4}$	-	-
68.	PY-136	411,3	$C_{19}H_{31}BrN_4O$	<b><math>7,70 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
69.	PY-137	423,3	$C_{20}H_{31}BrN_4O$	<b><math>4,70 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
70.	PY-138	263,7	$C_{14}H_{18}ClN_3$	$1,90 \times 10^{-4}$	-	-
71.	PY-139	291,8	$C_{16}H_{22}ClN_3$	$1,75 \times 10^{-4}$	-	-
72.	PY-140	450,4	$C_{20}H_{30}N_6O_6$	$3,40 \times 10^{-5}$	-	-
73.	PY-141	402,4	$C_{21}H_{30}N_4O_4$	$3,20 \times 10^{-5}$	-	-
74.	PY-142	536,3	$C_{23}H_{28}Br_2N_4O$	$2,90 \times 10^{-5}$	-	-
75.	PY-143	500,5	$C_{23}H_{28}N_6O_7$	$1,50 \times 10^{-5}$	-	-
76.	PY-144	472,5	$C_{23}H_{28}N_4O_5S$	$2,70 \times 10^{-5}$	-	-
77.	PY-145	566,6	$C_{29}H_{34}N_4O_8$	$2,70 \times 10^{-5}$	-	-
78.	PY-146	464,5	$C_{25}H_{28}N_4O_5$	$2,75 \times 10^{-5}$	-	-
79.	PY-147	477,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$5,80 \times 10^{-5}$	-	-
80.	PY-148	489,4	$C_{25}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$2,08 \times 10^{-4}$	-	-
81.	PY-149	509,4	$C_{28}H_{30}Cl_2N_4O$	$5,10 \times 10^{-4}$	-	-
82.	PY-150	439,4	$C_{22}H_{32}Cl_2N_4O$	$3,50 \times 10^{-5}$	-	-
83.	PY-151	427,4	$C_{21}H_{32}Cl_2N_4O$	$3,60 \times 10^{-5}$	-	-
84.	PY-153	273,7	$C_{14}H_{12}ClN_3O$	$3,70 \times 10^{-4}$	-	-
85.	PY-154	413,3	$C_{19}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$2,50 \times 10^{-5}$	-	-
86.	PY-155	407,3	$C_{20}H_{24}Cl_2N_4O$	$5,60 \times 10^{-5}$	-	-
87.	PY-157	324,3	$C_{17}H_{16}N_4O_3$	$3,90 \times 10^{-4}$	-	-
88.	PY-158	472,4	$C_{22}H_{28}N_6O_6$	$2,10 \times 10^{-5}$	-	-
89.	PY-159	508,2	$C_{22}H_{28}Br_2N_4$	$4,00 \times 10^{-5}$	-	-
90.	PY-160	444,5	$C_{22}H_{28}N_4O_4S$	$2,30 \times 10^{-5}$	-	-
91.	PY-161	538,5	$C_{28}H_{34}N_4O_7$	$2,80 \times 10^{-5}$	-	-
92.	PY-162	431,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4$	$4,80 \times 10^{-5}$	-	-
93.	PY-163	484,5	$C_{23}H_{28}N_6O_6$	$4,20 \times 10^{-5}$	-	-
94.	PY-164	520,3	$C_{23}H_{28}Br_2N_4$	$3,90 \times 10^{-5}$	-	-
95.	PY-165	643,6	$C_{24}H_{26}BrCl_5N_4O$	$3,98 \times 10^{-4}$	-	-
96.	PY-167	594,7	$C_{25}H_{29}Cl_5N_4O_2$	$4,37 \times 10^{-4}$	-	-
97.	PY-168	580,7	$C_{24}H_{27}Cl_5N_4O_2$	$4,47 \times 10^{-4}$	-	-
98.	PY-169	614,8	$C_{28}H_{29}Cl_5N_4O$	$4,17 \times 10^{-4}$	-	-
99.	PY-170	568,7	$C_{23}H_{27}Cl_5N_4O_2$	$4,57 \times 10^{-4}$	-	-
100.	PY-172	433,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O$	$7,10 \times 10^{-5}$	-	-

101.	PY-173	447,3	$C_{22}H_{24}Cl_2N_4O_2$	$4,50 \times 10^{-4}$	-	-
102.	PY-174	445,3	$C_{23}H_{26}Cl_2N_4O$	$3,40 \times 10^{-5}$	-	-
103.	PY-175	419,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_4O$	$1,20 \times 10^{-4}$	-	-
104.	PY-181	554,3	$C_{23}H_{30}Br_2N_4O_2$	-	-4,77	-
105.	PY-185	526,2	$C_{21}H_{26}Br_2N_4O_2$	$4,90 \times 10^{-4}$	0	<b>&lt;23,92±2,07</b>
106.	PY-186	490,4	$C_{21}H_{26}N_6O_8$	$5,25 \times 10^{-4}$	-10,72	-
107.	PY-187	437,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O_2$	>0,001	-39,29	-
108.	PY-188	556,2	$C_{22}H_{28}Br_2N_4O_3$	>0,001	-25,00	-
109.	PY-189	502,4	$C_{22}H_{26}N_6O_8$	>0,001	-	-
110.	PY-190	449,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O_2$	>0,001	-3,58	-
111.	PY-192	449,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$3,70 \times 10^{-4}$	-	-
112.	PY-193	435,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4O$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
113.	PY-194	421,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O$	$1,60 \times 10^{-3}$	-	-
114.	PY-195	373,3	$C_{17}H_{26}Cl_2N_4O$	$6,92 \times 10^{-3}$	-	-
115.	PY-196	385,3	$C_{18}H_{26}Cl_2N_4O$	$6,76 \times 10^{-3}$	-	-
116.	PY-202	492,5	$C_{22}H_{32}N_6O_7$	$6,19 \times 10^{-5}$	-	-
117.	PY-203	480,5	$C_{21}H_{32}N_6O_7$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
118.	PY-204	411,3	$C_{19}H_{24}Cl_2N_4S$	$3,60 \times 10^{-5}$	-	-
119.	PY-205	423,4	$C_{20}H_{24}Cl_2N_4S$	$3,40 \times 10^{-5}$	-	-
120.	PY-212	438,4	$C_{23}H_{26}N_4O_5$	<b><math>6,00 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
121.	PY-216	552,5	$C_{28}H_{32}N_4O_8$	<b><math>5,70 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
122.	PY-236	385,3	$C_{19}H_{30}Cl_2N_4$	$6,30 \times 10^{-3}$	-	-
123.	PY-245	419,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
124.	PY-254	331,2	$C_{15}H_{24}Cl_2N_4$	$3,00 \times 10^{-4}$	-4,77	<b>28,64±14,49</b>
125.	PY-255	343,2	$C_{16}H_{24}Cl_2N_4$	$5,80 \times 10^{-4}$	-	<b>25,17±1,41</b>
126.	PY-261	512,3	$C_{20}H_{24}Br_2N_4S$	<b><math>3,50 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
127.	PY-262	500,2	$C_{19}H_{24}Br_2N_4S$	<b><math>4,30 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
128.	PY-264	473,4	$C_{22}H_{26}BrN_4OS$	-	-	<b>33,04±22,03</b>
129.	PY-271	313,7	$C_{17}H_{16}ClN_3O$	$6,50 \times 10^{-4}$	-	-
130.	PY-272	526,2	$C_{23}H_{27}BrCl_2N_4O$	<b><math>1,40 \times 10^{-4}</math></b>	-	-
131.	PY-273	451,8	$C_{22}H_{25}Cl_3N_4$	-	-	<b>56,46±8,24</b>
132.	PY-274	527,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_6O_6$	$5,37 \times 10^{-4}$	-	-
133.	PY-279	461,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4O$	<b><math>8,00 \times 10^{-5}</math></b>	-	-
134.	PY-283	345,2	$C_{15}H_{22}Cl_2N_4O$	>0,001	-	<b>&lt;36,13±22,53</b>
135.	PY-284	419,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_4O$	$2,60 \times 10^{-4}$	-66,67	<b>50,19±6,88</b>
136.	PY-285	453,7	$C_{21}H_{23}Cl_3N_4O$	$2,45 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;41,58±4,28</b>
137.	PY-286	449,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$6,31 \times 10^{-4}$	-	-
138.	PY-291	479,3	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O_3$	$5,89 \times 10^{-4}$	-	-
139.	PY-292	465,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$3,50 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;17,95±10,15</b>
140.	PY-293	477,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$2,62 \times 10^{-4}$	-	<b>35,25±9,17</b>

141.	PY-294	479,3	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O_3$	$5,89 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;22,81±3,11</b>
142.	PY-295	435,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_4O_2$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	<b>59,89±6,41</b>
143.	PY-296	241,7	$C_{11}H_{16}ClN_3O$	$2,10 \times 10^{-3}$	-	-
144.	PY-297	269,7	$C_{13}H_{20}ClN_3O$	$7,30 \times 10^{-4}$	-	-
145.	PY-298	283,7	$C_{14}H_{22}ClN_3O$	$4,70 \times 10^{-4}$	-	-
146.	PY-299	326,8	$C_{16}H_{27}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
147.	PY-300	338,8	$C_{17}H_{27}ClN_4O$	$6,80 \times 10^{-4}$	-	-
148.	PY-301	340,8	$C_{16}H_{25}ClN_4O_2$	>0,001	-	-
149.	PY-331	489,4	$C_{25}H_{30}Cl_2N_4O_2$	-	-14,29	-
150.	PY-334	387,3	$C_{17}H_{24}Cl_2N_4O_2$	$3,90 \times 10^{-5}$	-	-
151.	PY-335	417,3	$C_{18}H_{26}Cl_2N_4O_3$	$1,40 \times 10^{-4}$	-	-
152.	PY-336	401,2	$C_{17}H_{22}Cl_2N_4O_3$	$2,20 \times 10^{-4}$	-	-
153.	PY-338	390,2	$C_{16}H_{16}BrN_5O_2$	$7,80 \times 10^{-4}$	-	-
154.	PY-341	423,3	$C_{19}H_{27}BrN_4O_2$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
155.	PY-342	584,4	$C_{31}H_{27}BrN_3O_2P$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
156.	PY-344	624,8	$C_{26}H_{31}Cl_5N_4O_3$	$6,30 \times 10^{-4}$	-	-
157.	PY-346	624,8	$C_{26}H_{31}Cl_5N_4O_3$	$6,30 \times 10^{-3}$	-	-
158.	PY-353 (амфедазол)	405,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4$	$1,60 \times 10^{-5}$	-	<b>37,68±10,78-</b>
159.	PY-354	417,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4$	$2,40 \times 10^{-4}$	-33,34	<b>&lt;46,26±14,31</b>
160.	PY-355	419,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_4O$	$1,60 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;47,04±14,45</b>
161.	PY-374	576,2	$C_{21}H_{28}Br_2N_4O_5$	$5,20 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;38,62±0,04</b>
162.	PY-375	562,2	$C_{21}H_{30}Br_2N_4O_4$	$5,70 \times 10^{-4}$	-	-
163.	PY-376	574,3	$C_{22}H_{30}Br_2N_4O_4$	$5,20 \times 10^{-4}$	-	<b>&lt;49,22±12,03</b>
164.	PY-377	576,2	$C_{21}H_{28}Br_2N_4O_5$	$5,20 \times 10^{-4}$	-	-
165.	PY-378	562,2	$C_{21}H_{30}Br_2N_4O_4$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
166.	PY-379	574,3	$C_{22}H_{30}Br_2N_4O_4$	$2,60 \times 10^{-4}$	-	-
167.	PY-380	576,2	$C_{21}H_{28}Br_2N_4O_5$	$2,10 \times 10^{-4}$	-	-
168.	PY-390	312,4	$C_{19}H_{28}N_4$	$9,60 \times 10^{-5}$	-	-
169.	PY-391	410,5	$C_{19}H_{30}N_4O_4S$	$5,80 \times 10^{-5}$	-	-
170.	PY-392	508,4	$C_{19}H_{34}N_4O_8P_2$	$5,80 \times 10^{-5}$	-	-
171.	PY-393	513,3	$C_{19}H_{30}Cl_2N_4O_8$	$1,17 \times 10^{-4}$	-	-
172.	PY-394	428,5	$C_{23}H_{32}N_4O_4$	$4,90 \times 10^{-5}$	-	-
173.	PY-395	434,5	$C_{22}H_{34}N_4O_5$	$1,38 \times 10^{-4}$	-	-
174.	PY-396	399,3	$C_{19}H_{28}Cl_2N_4O$	$5,26 \times 10^{-4}$	-	-
175.	PY-397	488,2	$C_{19}H_{28}Br_2N_4O$	$3,69 \times 10^{-4}$	-	-
176.	PY-398	371,3	$C_{18}H_{28}Cl_2N_4$	$3,23 \times 10^{-4}$	-	-
177.	PY-399	499,3	$C_{18}H_{28}Cl_2N_4O_8$	$2,40 \times 10^{-4}$	-	-
178.	PY-400	397,3	$C_{18}H_{29}BrN_4O$	$3,02 \times 10^{-4}$	-	-
179.	PY-401	425,3	$C_{19}H_{29}BrN_4O_2$	$4,94 \times 10^{-4}$	-	-

180.	PY-412	412,3	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> BrN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	7,30x10 <sup>-4</sup>	-	-
181.	PY-437	465,4	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
182.	PY-438	626,5	C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> P	1,00x10 <sup>-3</sup>	-	-
183.	PY-441	443,3	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,80x10 <sup>-4</sup>	-	-
184.	PY-446	496,6	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	<b>8,90x10<sup>-5</sup></b>	-	-
185.	PY-451	490,5	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	<b>1,10x10<sup>-4</sup></b>	-96,00	-
186.	PY-457	546,3	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	4,59x10 <sup>-4</sup>	-64,00	-
187.	PY-458	504,2	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	3,76x10 <sup>-4</sup>	-89,48	-
188.	PY-467	504,4	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub>	-	-56,00	-
189.	PY-470	357,3	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	5,62x10 <sup>-4</sup>	-28,58	-
190.	PY-473	446,2	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	<b>6,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
191.	PY-474	508,2	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	-	-	<b>48,68±6,15</b>
192.	PY-475	508,2	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	2,40x10 <sup>-4</sup>	-	-
193.	PY-476	488,4	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	<b>7,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
194.	PY-480	399,3	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2,30x10 <sup>-4</sup>	-	-
195.	PY-481	411,3	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	7,30x10 <sup>-4</sup>	-	-
196.	PY-482	399,2	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	7,10x10 <sup>-3</sup>	-	-
197.	PY-486	516,2	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
198.	PY-487	504,2	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,90x10 <sup>-5</sup>	-	-
199.	PY-490	477,4	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,00x10 <sup>-4</sup>	-	-
200.	PY-498	413,3	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
201.	PY-499	387,3	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	9,40x10 <sup>-4</sup>	-	-
202.	PY-500	552,3	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
203.	PY-501	449,3	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,50x10 <sup>-4</sup>	-	-
204.	PY-502	465,4	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	1,83x10 <sup>-4</sup>	-76,00	-
205.	PY-503	449,3	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	6,40x10 <sup>-4</sup>	-80,00	-
206.	PY-504	343,2	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	4,40x10 <sup>-4</sup>	-	<b>46,06±8,87</b>
207.	PY-505	345,2	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	8,70x10 <sup>-4</sup>	-	<b>&lt;55,15±6,31</b>
208.	PY-506	357,3	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	1,90x10 <sup>-4</sup>	-	-
209.	PY-508	329,2	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	>0,001	-	-
210.	PY-510	489,4	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-4,00	-
211.	PY-513	495,8	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,87x10 <sup>-4</sup>	-44,00	-
212.	PY-515	331,2	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	1,70x10 <sup>-4</sup>	-	<b>40,90±4,14</b>
213.	PY-516	330,2	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	2,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
214.	PY-517	351,2	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	2,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
215.	PY-526	397,3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	<b>5,60x10<sup>-5</sup></b>	-	-
216.	PY-527	399,3	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	<b>1,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
217.	PY-530	490,5	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	-	-7,15	-
218.	PY-531	463,4	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,30x10 <sup>-4</sup>	-	-

219.	PY-533	538,2	$C_{22}H_{26}Br_2N_4O_2$	$1,10 \times 10^{-4}$	-12,00	-
220.	PY-534	502,4	$C_{19}H_{26}Br_2N_4O_2$	-	-56,00	-
221.	PY-535	380,3	$C_{20}H_{27}Cl_2N_3$	$7,90 \times 10^{-4}$	-31,12	-
222.	PY-536	394,3	$C_{20}H_{25}Cl_2N_3O$	$2,50 \times 10^{-4}$	-	-
223.	PY-537	540,9	$C_{28}H_{31}BrClN_3O$	$7,90 \times 10^{-4}$	-	-
224.	PY-538	442,3	$C_{23}H_{28}BrN_3O$	$6,20 \times 10^{-4}$	-30,31	-
225.	PY-539	500,4	$C_{26}H_{34}BrN_3O_2$	$3,00 \times 10^{-4}$	-66,67	<b><math>56,67 \pm 16,05</math></b>
226.	PY-540	550,4	$C_{29}H_{32}BrN_3O_3$	$2,10 \times 10^{-4}$	-	-
227.	PY-541	446,4	$C_{24}H_{29}Cl_2N_3O$	$6,10 \times 10^{-4}$	-64,00	-
228.	PY-542	396,3	$C_{21}H_{31}Cl_2N_3$	$6,10 \times 10^{-4}$	-	-
229.	PY-543	416,3	$C_{23}H_{27}Cl_2N_3$	$5,80 \times 10^{-4}$	-	-
230.	PY-544	492,4	$C_{26}H_{35}Cl_2N_3O_2$	$6,10 \times 10^{-4}$	-	-
231.	PY-546	478,4	$C_{26}H_{37}Cl_2N_3O$	$1,27 \times 10^{-4}$	0	-
232.	PY-547	514,9	$C_{28}H_{30}Cl_3N_3$	$3,90 \times 10^{-4}$	-	-
233.	PY-548	528,5	$C_{29}H_{35}Cl_2N_3O_2$	$1,70 \times 10^{-4}$	-	-
234.	PY-552	344,2	$C_{17}H_{18}BrN_3$	-	-32,15	-
235.	PY-553	345,3	$C_{16}H_{26}Cl_2N_4$	-	-39,29	-
236.	PY-555	359,2	$C_{16}H_{24}Cl_2N_4O$	-	-7,15	-
237.	PY-556	405,2	$C_{18}H_{20}IN_3$	-	-17,86	-
238.	PY-563	512,2	$C_{21}H_{28}Br_2N_4O$	<b><math>2,00 \times 10^{-5}</math></b>	-	<b><math>&lt; 34,40 \pm 4,78</math></b>
239.	PY-570	449,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4O$	$2,70 \times 10^{-5}$	-60,00	-
240.	PY-571	451,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4O_2$	-	-85,72	-
241.	PY-574	453,4	$C_{22}H_{30}Cl_2N_4O_2$	-	-	<b><math>&lt; 46,35 \pm 16,45</math></b>
242.	PY-575	483,4	$C_{23}H_{32}Cl_2N_4O_3$	-	-34,29	-
243.	PY-576	485,4	$C_{22}H_{30}Cl_2N_4O_4$	-	-48,58	<b><math>&lt; 20,56 \pm 10,48</math></b>
244.	PY-597	453,7	$C_{21}H_{23}Cl_3N_4O$	-	-71,43	-
245.	PY-598	451,8	$C_{22}H_{25}Cl_3N_4$	-	-17,15	-
246.	PY-602	451,2	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4O_2$	-	-	<b><math>39,26 \pm 15,11</math></b>
247.	PY-603	435,3	$C_{21}H_{24}Cl_2N_4O_2$	-	-	<b><math>42,15 \pm 14,02</math></b>
248.	PY-604	392,2	$C_{17}H_{18}BrN_3O_3$	-	-4,45	-
249.	PY-606	421,4	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O$	-	-	<b><math>34,21 \pm 7,87</math></b>
250.	PY-607	469,4	$C_{22}H_{30}Cl_2N_4O_3$	-	-25,72	-
251.	PY-608	453,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O_3$	$4,48 \times 10^{-4}$	-74,29	-
252.	PY-610	373,8	$C_{19}H_{20}ClN_3O_3$	$8,10 \times 10^{-4}$	-	-
253.	PY-613	517,4	$C_{23}H_{34}Cl_2N_4O_5$	$2,80 \times 10^{-4}$	-	-
254.	PY-614	435,3	$C_{22}H_{28}Cl_2N_4O$	$5,70 \times 10^{-5}$	-	-
255.	PY-615	447,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O$	$1,60 \times 10^{-4}$	-	-
256.	PY-616	449,3	$C_{22}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$1,80 \times 10^{-4}$	-54,29	-
257.	PY-617	510,2	$C_{21}H_{26}Br_2N_4O$	$2,90 \times 10^{-5}$	-	-
258.	PY-618	522,2	$C_{22}H_{26}Br_2N_4O$	$4,80 \times 10^{-5}$	-34,29	-

259.	PY-619	524,2	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	5,80x10 <sup>-4</sup>	-60,00	-
260.	PY-620	461,3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	4,10x10 <sup>-5</sup>	-	-
261.	PY-621	482,2	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	2,20x10 <sup>-5</sup>	-	-
262.	PY-625	392,4	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	-	-28,58	-
263.	PY-639	528,4	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	<b>3,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
264.	PY-641	484,5	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	<b>6,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
265.	PY-642	549,6	C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	2,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
266.	PY-643	540,0	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	6,00x10 <sup>-4</sup>	-	-
267.	PY-659	313,7	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O	4,5 x10 <sup>-5</sup>	-	-
268.	PY-660	348,2	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	>0,001	-	-
269.	PY-661	343,8	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	>0,001	-	-
270.	PY-662	363,8	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	>0,001	-	-
271.	PY-663	293,7	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	1,00x10 <sup>-4</sup>	-	-
272.	PY-664	315,7	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	2,80x10 <sup>-4</sup>	-	-
273.	PY-687	629,2	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> Br <sub>3</sub> N <sub>6</sub>	-	-21,06	-
274.	PY-691	442,5	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	<b>4,50x10<sup>-5</sup></b>	-	-
275.	PY-692	470,4	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	<b>6,10x10<sup>-5</sup></b>	-	-
276.	PY-694	540,4	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	<b>8,30x10<sup>-5</sup></b>	-	-
277.	PY-702	539,3	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	<b>9,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
278.	PY-703	534,4	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub> S	<b>1,10x10<sup>-5</sup></b>	-	-
279.	PY-704	436,5	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	<b>6,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
280.	PY-705	551,3	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S	2,70x10 <sup>-5</sup>	-	-
281.	PY-706	512,3	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> S	1,75x10 <sup>-5</sup>	0	-
282.	PY-707	448,5	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	2,00x10 <sup>-5</sup>	-	-
283.	PY-708	425,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	<b>2,50x10<sup>-4</sup></b>	0	-
284.	PY-709	514,2	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	<b>1,80x10<sup>-4</sup></b>	-	-
285.	PY-710	553,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S	<b>8,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
286.	PY-711	484,2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	<b>4,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
287.	PY-712	420,4	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	<b>5,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
288.	PY-713	409,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-21,06	-
289.	PY-714	498,1	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-10,53	-
290.	PY-717	399,4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	5,30x10 <sup>-4</sup>	0	-
291.	PY-718	411,4	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	1,50x10 <sup>-4</sup>	-25,00	-
292.	PY-719	413,3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	2,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
293.	PY-720	419,3	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	7,20x10 <sup>-4</sup>	0	<b>52,22±2,75</b>
294.	PY-721	467,4	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,20x10 <sup>-5</sup>	-	<b>&lt;32,66±16,39</b>
295.	PY-722	433,3	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	3,70x10 <sup>-5</sup>	0	-
296.	PY-723	453,8	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	1,30x10 <sup>-4</sup>	-25,00	-
297.	PY-724	465,8	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	1,90x10 <sup>-4</sup>	-	-
298.	PY-725	467,8	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O	6,40x10 <sup>-4</sup>	-	-

299.	PY-726	498,2	$C_{22}H_{27}BrCl_2N_4$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
300.	PY-727	510,2	$C_{23}H_{27}BrCl_2N_4$	$5,80 \times 10^{-4}$	-	-
301.	PY-728	512,2	$C_{22}H_{25}BrCl_2N_4O$	$5,80 \times 10^{-4}$	-	-
302.	PY-729	449,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4O$	$1,30 \times 10^{-4}$	-	-
303.	PY-730	461,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4O$	$4,60 \times 10^{-5}$	-12,50	-
304.	PY-731	463,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O_2$	$3,20 \times 10^{-4}$	-	-
305.	PY-732	433,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4$	$2,10 \times 10^{-4}$	-	-
306.	PY-733	445,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4$	$3,80 \times 10^{-5}$	-	-
307.	PY-734	447,4	$C_{23}H_{28}Cl_2N_4O$	$6,70 \times 10^{-4}$	-	-
308.	PY-746	499,6	$C_{26}H_{33}N_3O_5S$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
309.	PY-748	561,3	$C_{27}H_{35}Br_2N_3$	$5,30 \times 10^{-4}$	-	-
310.	PY-749	603,8	$C_{28}H_{30}Br_2ClN_3$	$1,70 \times 10^{-4}$	-	-
311.	PY-750	528,9	$C_{28}H_{28}Cl_3N_3O$	$5,90 \times 10^{-4}$	-	-
312.	PY-752	554,0	$C_{28}H_{28}ClN_3O_5S$	$5,40 \times 10^{-4}$	-	-
313.	PY-753	494,4	$C_{28}H_{29}Cl_2N_3O$	$6,10 \times 10^{-4}$	-	-
314.	PY-754	583,3	$C_{28}H_{29}Br_2N_3O$	$5,10 \times 10^{-4}$	-	-
315.	PY-756	505,6	$C_{28}H_{31}N_3O_4S$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
316.	PY-757	613,3	$C_{29}H_{31}Br_2N_3O_2$	$3,50 \times 10^{-4}$	-	-
317.	PY-758	471,5	$C_{24}H_{29}N_3O_5S$	$1,30 \times 10^{-4}$	-	-
318.	PY-759	423,5	$C_{20}H_{29}N_3O_5S$	$2,20 \times 10^{-4}$	-	-
319.	PY-760	418,3	$C_{22}H_{25}Cl_2N_3O$	$2,20 \times 10^{-4}$	-	-
320.	PY-761	443,5	$C_{22}H_{25}N_3O_5S$	$2,10 \times 10^{-4}$	-	-
321.	PY-774	504,2	$C_{18}H_{24}Br_2N_4O_3$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
322.	PY-776	447,3	$C_{19}H_{28}Cl_2N_4O_4$	$6,70 \times 10^{-4}$	-	-
323.	PY-777	490,2	$C_{18}H_{26}Br_2N_4O_2$	$1,20 \times 10^{-4}$	-	-
324.	PY-783	322,7	$C_{16}H_{19}ClN_2O_3$	$3,90 \times 10^{-4}$	-	-
325.	PY-784	321,1	$C_{14}H_{13}BrN_2O_2$	$9,30 \times 10^{-4}$	-	-
326.	PY-785	294,7	$C_{14}H_{15}ClN_2O_3$	$5,40 \times 10^{-4}$	-	-
327.	PY-786	488,4	$C_{23}H_{35}Cl_2N_3O_4$	$1,30 \times 10^{-4}$	-	-
328.	PY-787	442,3	$C_{21}H_{29}Cl_2N_3O_3$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
329.	PY-788	490,4	$C_{22}H_{33}Cl_2N_3O_5$	$3,30 \times 10^{-4}$	-	-
330.	PY-789	533,2	$C_{20}H_{27}Br_2N_3O_4$	$1,70 \times 10^{-4}$	-	-
331.	PY-790	462,3	$C_{20}H_{29}Cl_2N_3O_5$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
332.	PY-791	609,6	$C_{31}H_{35}N_3O_8S$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
333.	PY-792	579,6	$C_{30}H_{33}N_3O_7S$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
334.	PY-793	614,1	$C_{30}H_{32}ClN_3O_7S$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
335.	PY-794	551,6	$C_{28}H_{29}N_3O_7S$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
336.	PY-795	535,6	$C_{28}H_{29}N_3O_6S$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
337.	PY-828	329,2	$C_{15}H_{22}Cl_2N_4$	$1,40 \times 10^{-4}$	-	-
338.	PY-829	341,2	$C_{16}H_{22}Cl_2N_4$	$1,80 \times 10^{-4}$	-	-

339.	PY-830	343,2	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	8,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
340.	PY-831	371,3	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	3,20x10 <sup>-5</sup>	-	-
341.	PY-832	385,3	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	3,90x10 <sup>-5</sup>	-	-
342.	PY-833	405,3	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	3,70x10 <sup>-5</sup>	-	-
343.	PY-834	417,3	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	1,40x10 <sup>-4</sup>	-	-
344.	PY-835	370,4	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	<b>6,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
345.	PY-879	423,4	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> S	<b>3,30x10<sup>-5</sup></b>	-	-
346.	PY-880	425,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	<b>4,80x10<sup>-5</sup></b>	-	-
347.	PY-882	437,4	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> S	<b>4,30x10<sup>-5</sup></b>	-	-
348.	PY-883	439,4	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	<b>5,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
349.	PY-892	251,7	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> O	<b>5,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
350.	PY-898	352,2	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> BrN <sub>3</sub> O	<b>1,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
351.	PY-910	200,6	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	<b>&gt;0,001</b>	-	-
352.	PY-911	294,7	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>4,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
353.	PY-912	224,7	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub>	<b>&gt;0,001</b>	-	-
354.	PY-913	314,8	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub>	<b>&gt;0,001</b>	-	-
355.	PY-1148	315,7	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	4,60x10 <sup>-5</sup>	-	-
356.	PY-1149	418,2	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	8,80x10 <sup>-5</sup>	-	-
357.	PY-1150	404,2	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6,10x10 <sup>-4</sup>	-	-
358.	PY-1151	329,8	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	3,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
359.	PY-1152	432,3	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	5,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
360.	PY-1153	418,2	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	5,80x10 <sup>-4</sup>	-	-
361.	PY-1156	331,2	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	<b>1,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
362.	PY-1157	371,3	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	<b>3,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
363.	PY-1163	388,3	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O	<b>5,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
364.	PY-1183	475,4	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-	-	<b>46,90±18,55</b>
365.	PY-1184	487,4	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-	-	<b>46,41±7,69</b>
366.	PY-1185	489,4	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-	-	<b>26,50±10,52</b>
367.	PY-1189	461,3	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-	<b>&lt;23,92±2,07</b>
368.	PY-1190	463,3	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-	-	<b>52,83±7,35</b>
369.	PY-1191	498,2	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	<b>7,00x10<sup>-4</sup></b>	-	<b>&lt;53,74±17,44</b>
370.	PY-1192	411,7	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	<b>5,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
371.	PY-1193	439,8	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	<b>2,50x10<sup>-4</sup></b>	-	<b>&lt;23,92±2,07</b>
372.	PY-1194	474,2	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	<b>3,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
373.	PY-1196	486,2	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	<b>5,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
374.	PY-1197	488,2	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	<b>2,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
375.	PY-1199	461,4	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> BrFN <sub>4</sub> O	-	-	<b>73,95±12,55</b>
376.	PY-1200	463,4	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> BrFN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-	<b>57,29±5,64</b>
377.	PY-1201	395,3	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub>	<b>6,00x10<sup>-5</sup></b>	-	-
378.	PY-1202	423,3	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub>	<b>6,50x10<sup>-5</sup></b>	-	-



379.	PY-1204	435,3	$C_{22}H_{27}Cl_2FN_4$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	$<23,92 \pm 2,07$
380.	PY-1205	437,3	$C_{21}H_{25}Cl_2FN_4O$	$3,00 \times 10^{-4}$	-	$<35,94 \pm 11,84$
381.	PY-1206	357,3	$C_{17}H_{26}Cl_2N_4$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
382.	PY-1207	433,4	$C_{23}H_{30}Cl_2N_4$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
383.	PY-1208	358,3	$C_{16}H_{25}Cl_2N_5$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
384.	PY-1209	434,4	$C_{22}H_{29}Cl_2N_5$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
385.	PY-1210	343,4	$C_{18}H_{25}N_5O_2$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
386.	PY-1255	301,7	$C_{16}H_{13}ClFN_3$	$3,00 \times 10^{-4}$	-	-
387.	PY-1256	343,8	$C_{19}H_{19}ClFN_3$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
388.	PY-1257	377,8	$C_{22}H_{17}ClFN_3$	$8,00 \times 10^{-4}$	-	-
389.	PY-1273	453,1	$C_{18}H_{16}Br_2FN_3$	$1,10 \times 10^{-4}$	-	-
390.	PY-1274	437,3	$C_{22}H_{27}Cl_2FN_4$	$1,50 \times 10^{-5}$	-	-
391.	PY-1275	435,3	$C_{22}H_{25}Cl_2FN_4$	$1,30 \times 10^{-5}$	-	-
392.	PY-1276	449,3	$C_{23}H_{27}Cl_2FN_4$	$5,80 \times 10^{-5}$	-	-
393.	PY-1277	451,3	$C_{22}H_{25}Cl_2FN_4O$	$4,50 \times 10^{-5}$	-	-
394.	PY-1285	383,3	$C_{18}H_{24}Cl_2N_4O$	$1,60 \times 10^{-4}$	-	-
395.	PY-1286	461,3	$C_{23}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$5,60 \times 10^{-5}$	-	-
396.	PY-1287	481,8	$C_{23}H_{27}Cl_3N_4O$	$5,60 \times 10^{-5}$	-	-
397.	PY-1288	493,8	$C_{24}H_{27}Cl_3N_4O$	$1,80 \times 10^{-4}$	-	-
398.	PY-1289	495,8	$C_{23}H_{25}Cl_3N_4O_2$	$5,50 \times 10^{-5}$	-	-
399.	PY-1290	473,4	$C_{25}H_{30}Cl_2N_4O$	$1,10 \times 10^{-4}$	-	-
400.	PY-1291	511,4	$C_{24}H_{32}Cl_2N_4O_4$	$5,50 \times 10^{-5}$	-	-
401.	PY-1292	509,4	$C_{24}H_{30}Cl_2N_4O_4$	$1,80 \times 10^{-4}$	-	-
402.	PY-1297	308,8	$C_{15}H_{21}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
403.	PY-1298	322,8	$C_{16}H_{23}ClN_4O$	$5,00 \times 10^{-4}$	-	-
404.	PY-1299	322,7	$C_{15}H_{19}ClN_4O_2$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
405.	PY-1300	336,8	$C_{16}H_{21}ClN_4O_2$	$>0,001$	-	-
406.	PY-1301	346,7	$C_{17}H_{16}ClFN_4O$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
407.	PY-1302	360,8	$C_{18}H_{18}ClFN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
408.	PY-1303	346,7	$C_{17}H_{16}ClFN_4O$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
409.	PY-1304	360,8	$C_{18}H_{18}ClFN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
410.	PY-1306	410,8	$C_{19}H_{18}ClF_3N_4O$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
411.	PY-1307	342,8	$C_{18}H_{19}ClN_4O$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
412.	PY-1308	356,8	$C_{19}H_{21}ClN_4O$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
413.	PY-1309	356,8	$C_{19}H_{21}ClN_4O$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
414.	PY-1310	370,8	$C_{20}H_{23}ClN_4O$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
415.	PY-1311	372,8	$C_{19}H_{21}ClN_4O_2$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
416.	PY-1312	370,8	$C_{20}H_{23}ClN_4O$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
417.	PY-1313	497,0	$C_{25}H_{25}ClN_4O_3S$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
418.	PY-1314	457,9	$C_{26}H_{24}ClN_5O$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-

419.	PY-1315	266,7	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O	<b>&gt;0,001</b>	-	-
420.	PY-1316	252,7	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub> O	<b>7,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
421.	PY-1317	320,8	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>4</sub> O	<b>1,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
422.	PY-1318	334,8	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O	<b>1,00x10<sup>-4</sup></b>	-	-
423.	PY-1325	221,6	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub>	<b>6,80x10<sup>-5</sup></b>	-	-
424.	PY-1326	247,7	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub>	<b>7,10x10<sup>-5</sup></b>	-	-
425.	PY-1327	263,7	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub>	<b>3,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
426.	PY-1330	315,2	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	<b>2,70x10<sup>-4</sup></b>	-	-
427.	PY-1331	355,3	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	<b>1,50x10<sup>-4</sup></b>	-	-
428.	PY-1333	221,6	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub>	<b>1,20x10<sup>-4</sup></b>	-	-
429.	PY-1355	418,9	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	<b>1,80x10<sup>-4</sup></b>	-	<b>70,93±7,99</b>
430.	PY-1356	538,6	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> S <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-	-	<b>41,03±11,74</b>
431.	PY-1361	364,2	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>36,85±14,10</b>
432.	PY-1362	378,3	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>45,22±24,89</b>
433.	PY-1363	390,3	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>39,09±6,56</b>
434.	PY-1364	392,3	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>33,63±4,84</b>
435.	PY-1365	406,3	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>43,20±2,42</b>
436.	PY-1366	440,3	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> BrFN <sub>3</sub> O	-	-	<b>26,95±11,34</b>
437.	PY-1369	421,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> BrFN <sub>4</sub> O	-	-	<b>57,40±2,07</b>
438.	PY-1370	435,4	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> BrFN <sub>4</sub> O	-	-	<b>35,45±14,33</b>
439.	PY-1390	449,4	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> BrFN <sub>4</sub> O	-	-	<b>69,47±7,57</b>
440.	PYC-12	357,2	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	5,04x10 <sup>-4</sup>	-	-
441.	PYC-13	355,3	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	1,67x10 <sup>-4</sup>	-	-
442.	PYC-14	343,2	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	7,85x10 <sup>-4</sup>	-	-
443.	PYC-23	348,8	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,00x10 <sup>-3</sup>	-	-
444.	PYC-27	362,8	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2,48x10 <sup>-4</sup>	-	-
445.	PYC-38	382,8	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2,35x10 <sup>-5</sup>	-58,33	-
446.	PYC-39	378,8	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2,37x10 <sup>-5</sup>	-	-
447.	PYC-40	378,8	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	5,20x10 <sup>-5</sup>	-	-
448.	PYC-41	373,3	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	4,02x10 <sup>-4</sup>	-	-
449.	PYC-42	348,8	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O	5,70x10 <sup>-5</sup>	-	-
450.	PYC-44	380,8	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	8,70x10 <sup>-4</sup>	-	-
451.	PYC-46	417,3	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	3,20x10 <sup>-4</sup>	-41,67	-
452.	PYC-47	437,3	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,20x10 <sup>-3</sup>	-	-
453.	PYC-48	405,3	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	3,20x10 <sup>-4</sup>	-	-
454.	PYC-49	376,8	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,70x10 <sup>-5</sup>	-	-
455.	PYC-50	378,8	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2,60x10 <sup>-4</sup>	-	-
456.	PYC-51	334,8	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,00x10 <sup>-3</sup>	-	-
457.	PYC-52	320,8	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>4</sub> O	1,00x10 <sup>-3</sup>	-	-
458.	PYC-60	364,8	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	4,10x10 <sup>-4</sup>	-	-
459.	PYC-65	388,9	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>4</sub> O	4,63x10 <sup>-5</sup>	-	-

460.	PYC-66	390,9	$C_{20}H_{27}ClN_4O_2$	$4,61 \times 10^{-5}$	-70,83	-
461.	PYC-67	364,8	$C_{18}H_{25}ClN_4O_2$	$2,46 \times 10^{-5}$	-	-
462.	PYC-68	362,8	$C_{18}H_{23}ClN_4O_2$	$4,14 \times 10^{-5}$	-	-
463.	PYC-70	336,8	$C_{16}H_{21}ClN_4O_2$	$7,13 \times 10^{-5}$	-	-
464.	RUS -0079	369,8	$C_{20}H_{24}ClN_5$	-	-46,67	-
465.	RUS -0080	401,8	$C_{20}H_{24}ClN_5O_2$	-	-17,78	-
466.	RUS -0081	399,9	$C_{21}H_{26}ClN_5O$	-	-63,64	-
467.	PYC-91	271,3	$C_{14}H_{17}N_5O$	-	-6,25	-
468.	PYC-94	401,4	$C_{18}H_{25}ClN_4O_2$	-	-54,55	-
469.	PYC-95	399,3	$C_{19}H_{28}Cl_2N_4O$	-	-9,09	-
470.	PYC-96	387,3	$C_{18}H_{28}Cl_2N_4O$	-	-6,06	-
471.	PYC-97	426,9	$C_{23}H_{27}ClN_4O_2$	-	-84,85	-
472.	PYC-98	400,8	$C_{21}H_{25}ClN_4O_2$	-	-81,82	-
473.	AЖ-16	349,8	$C_{17}H_{20}ClN_3O_3$	$3,00 \times 10^{-4}$	-	-
474.	AЖ-17	389,8	$C_{20}H_{24}ClN_3O_3$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
475.	AЖ-18	497,4	$C_{24}H_{34}Cl_2N_4O_3$	$4,50 \times 10^{-5}$	-	-
476.	AЖ-19	499,4	$C_{23}H_{32}Cl_2N_4O_4$	$2,60 \times 10^{-4}$	-	-
477.	AЖ-20	485,4	$C_{23}H_{34}Cl_2N_4O_3$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
478.	AЖ-21	455,4	$C_{22}H_{32}Cl_2N_4O_2$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
479.	AЖ-22	371,3	$C_{17}H_{24}Cl_2N_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
480.	AЖ-23	441,8	$C_{21}H_{27}Cl_3N_4$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
481.	AЖ-24	464,2	$C_{20}H_{26}Cl_4N_4$	$4,00 \times 10^{-4}$	-	-
482.	AЖ-25	429,8	$C_{20}H_{27}Cl_3N_4$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
483.	AЖ-26	413,3	$C_{20}H_{27}Cl_2FN_4$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
484.	AЖ-27	385,3	$C_{18}H_{23}Cl_2FN_4$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
485.	AЖ-41	289,2	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
486.	AЖ-42	303,2	$C_{13}H_{20}Cl_2N_4$	$5,00 \times 10^{-4}$	-	-
487.	AЖ-43	319,2	$C_{13}H_{20}Cl_2N_4O$	$5,00 \times 10^{-4}$	-	-
488.	AЖ-44	319,2	$C_{13}H_{20}Cl_2N_4O$	$>0,001$	-	-
489.	AЖ-45	260,1	$C_{11}H_{15}Cl_2N_3$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
490.	AЖ-46	294,6	$C_{11}H_{14}Cl_3N_3$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
491.	AЖ-47	274,1	$C_{12}H_{17}Cl_2N_3$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
492.	AЖ-48	308,6	$C_{12}H_{16}Cl_3N_3$	$8,50 \times 10^{-5}$	-	-
493.	AЖ-49	288,2	$C_{13}H_{19}Cl_2N_3$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
494.	AЖ-50	276,1	$C_{11}H_{15}Cl_2N_3O$	$7,00 \times 10^{-4}$	-	-
495.	AЖ-51	290,1	$C_{12}H_{17}Cl_2N_3O$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
496.	AЖ-52	306,1	$C_{12}H_{17}Cl_2N_3O_2$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
497.	AЖ-53	352,3	$C_{14}H_{23}Cl_2N_3OS$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
498.	AЖ-54	427,1	$C_{13}H_{21}Br_2N_3OS$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
499.	AЖ-55	441,2	$C_{14}H_{23}Br_2N_3OS$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
500.	AЖ-56	348,3	$C_{15}H_{23}Cl_2N_3S$	$4,50 \times 10^{-5}$	-	-

501.	АЖ-57	350,3	$C_{14}H_{21}Cl_2N_3OS$	$4,00 \times 10^{-4}$	-	-
502.	АЖ-58	366,3	$C_{14}H_{21}Cl_2N_3O_2S$	$4,00 \times 10^{-4}$	-	-
503.	АЖ-59	412,4	$C_{20}H_{27}Cl_2N_3S$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
504.	АЖ-60	288,7	$C_{12}H_{17}ClN_2O_2S$	$5,00 \times 10^{-4}$	-	-
505.	АЖ-61	286,8	$C_{13}H_{19}ClN_2OS$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
506.	АЖ-62	415,7	$C_{16}H_{16}BrClN_2O_2S$	$5,00 \times 10^{-4}$	-	-
507.	АЖ-63	330,8	$C_{15}H_{23}ClN_2O_2S$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
508.	АЖ-64	453,1	$C_{21}H_{17}Cl_4N_3$	$6,00 \times 10^{-4}$	-	-
509.	АЖ-65	463,8	$C_{23}H_{25}Cl_3N_4$	$8,00 \times 10^{-4}$	-	-
510.	АЖ-66	491,8	$C_{25}H_{29}Cl_3N_4$	$>0,001$	-	-
511.	АЖ-67	388,2	$C_{20}H_{19}Cl_2N_3O$	$>0,001$	-	-
512.	АЖ-68	427,3	$C_{20}H_{28}Cl_2N_4O_2$	$7,00 \times 10^{-5}$	-	-
513.	АЖ-69	441,3	$C_{21}H_{30}Cl_2N_4O_2$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
514.	АЖ-70	411,3	$C_{19}H_{24}Cl_2N_4O_2$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
515.	АЖ-71	425,3	$C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_2$	$4,00 \times 10^{-5}$	-	-
516.	АЖ-72	439,3	$C_{21}H_{28}Cl_2N_4O_2$	$3,00 \times 10^{-5}$	-	-
517.	АЖ-73	453,3	$C_{21}H_{26}Cl_2N_4O_3$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
518.	АЖ-74	438,4	$C_{22}H_{33}Cl_2N_5$	$6,00 \times 10^{-5}$	-	-
519.	АЦИ-1	240,6	$C_{10}H_{13}ClN_4O$	$3,00 \times 10^{-4}$	-	-
520.	АЦИ-2	330,8	$C_{17}H_{19}ClN_4O$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
521.	АЦИ-3	296,7	$C_{14}H_{21}ClN_4O$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
522.	АЦИ-4	308,8	$C_{15}H_{21}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
523.	АЦИ-5	334,7	$C_{16}H_{16}ClFN_4O$	$8,00 \times 10^{-5}$	-	-
524.	АЦИ-6	384,7	$C_{17}H_{16}ClF_3N_4O$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
525.	АЦИ-7	358,8	$C_{19}H_{23}ClN_4O$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
526.	АЦИ-8	344,8	$C_{18}H_{21}ClN_4O$	$7,00 \times 10^{-5}$	-	-
527.	АЦИ-9	385,6	$C_{16}H_{15}Cl_3N_4O$	$3,00 \times 10^{-4}$	-	-
528.	АЦИ-10	426,8	$C_{20}H_{22}ClF_3N_4O$	$4,00 \times 10^{-4}$	-	-
529.	АЦИ-11	386,9	$C_{21}H_{27}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
530.	АЦИ-12	427,7	$C_{19}H_{21}Cl_3N_4O$	$4,00 \times 10^{-4}$	-	-
531.	АЦИ-13	266,7	$C_{12}H_{15}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-
532.	АЦИ-14	322,8	$C_{16}H_{23}ClN_4O$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
533.	АЦИ-15	386,8	$C_{20}H_{23}ClN_4O_2$	$2,00 \times 10^{-4}$	-	-
534.	АЦИ-16	372,8	$C_{20}H_{25}ClN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
535.	АЦИ-17	384,9	$C_{21}H_{25}ClN_4O$	$1,50 \times 10^{-4}$	-	-
536.	АЦИ-18	410,8	$C_{22}H_{20}ClFN_4O$	$1,00 \times 10^{-4}$	-	-
537.	СУМ-38	329,8	$C_{17}H_{16}ClN_3S$	-	-29,20	-
538.	СУМ-39	283,7	$C_{12}H_{14}ClN_3OS$	-	-21,83	-
539.	СУМ-40	344,3	$C_{15}H_{19}Cl_2N_3S$	-	-33,33	-
540.	СУМ-45	403,9	$C_{20}H_{22}ClN_3O_2S$	-	-29,20	-

541.	Амиодарон	681,8	$C_{25}H_{30}I_2NO_3Cl$	$1,70 \times 10^4$	-	-
542.	Хинидин	324,42	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	$3,40 \times 10^4$		
543.	Морицизин	463,98	$C_{22}H_{25}N_3O_4S$	$5,10 \times 10^5$		
544.	Зонипорид	374,8	$C_{17}H_{16}N_6O$ $HCl \cdot H_2O$	-	-	$48,05 \pm 7,09$

Примечание: «-» не изучалось.

Результаты прогноза в PASS<sup>1</sup> для производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов видов биологической активности, релевантных кардиопротекторной.

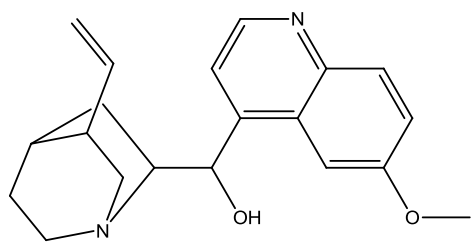
№	Вид активности <sup>2</sup>	N(P <sub>a</sub> >P <sub>i</sub> )	%(P <sub>a</sub> >P <sub>i</sub> )
<b><i>Антиаритмическая</i></b>			
1.	Antiarrhythmic	308	22,1
2.	Sodium channel blocker	355	25,5
3.	Potassium channel blocker	325	23,3
4.	Calcium channel blocker	284	20,24
5.	Beta 1 adrenoreceptor antagonist	24	1,7
6.	Sodium/hydrogen exchanger 1 inhibitor	1	0,1
7.	Всего	732	52,5
<b><i>Противоишемическая</i></b>			
8.	Antiischemic	530	38,0
9.	Calcium channel blocker	284	20,4
10.	Myocardial ischemia treatment	289	20,7
11.	Nitric oxide donor	3	0,2
12.	Adenosine A1 receptor agonist	0	0,0
13.	Sodium/hydrogen exchanger 1 inhibitor	1	0,1
14.	Всего	587	42,1
<b><i>Кардиотоническая</i></b>			
15.	Cardiotonic	397	28,5
16.	Cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor	907	65,1
17.	Phosphodiesterase inhibitor	935	67,1
18.	Calcium channel activator	490	35,2
19.	Inotropic	801	57,5
20.	Phosphodiesterase III inhibitor	80	5,7
21.	Beta 1 adrenoreceptor agonist	31	2,2
22.	Beta adrenoreceptor agonist	8	0,6
23.	Dopamine agonist	69	5,0
24.	Всего	1126	80,8

Примечание: P<sub>a</sub> - вероятность наличия данного вида активности; P<sub>i</sub> – вероятность отсутствия данного вида активности; N – число соединений у которых по прогнозу наблюдается указанный уровень данного вида активности; % - процент таких соединений.

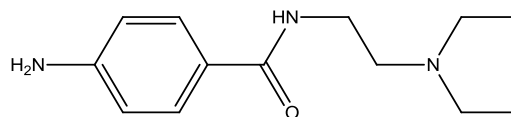
<sup>1</sup> - всего прогноз выполнен для 1393 структур.

<sup>2</sup> - названия активностей соответствуют языку и встроенному списку программы PASS.

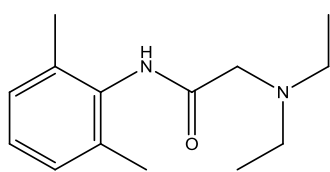
Препараты-стандарты антиаритмической активности для проведения прогноза в ИТ  
Микрокосм методом сходства к эталонам.



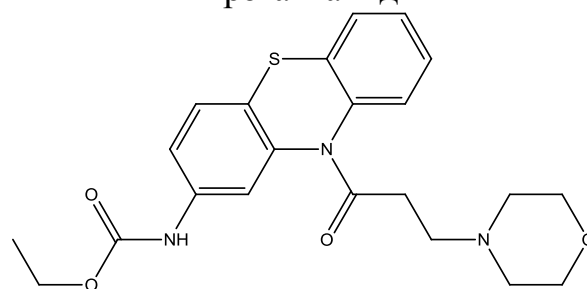
хинидин



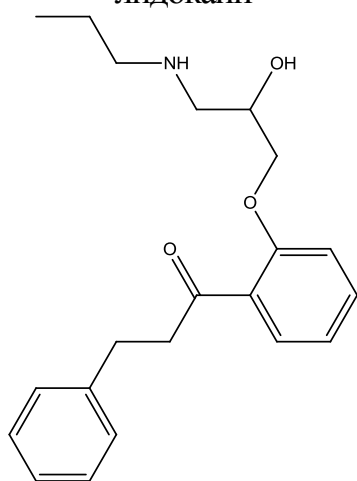
прокаинамид



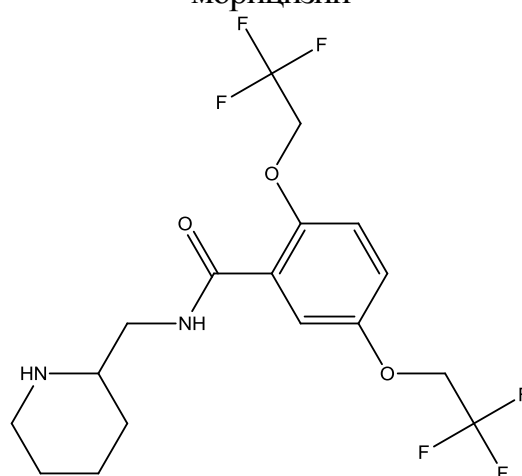
лидокаин



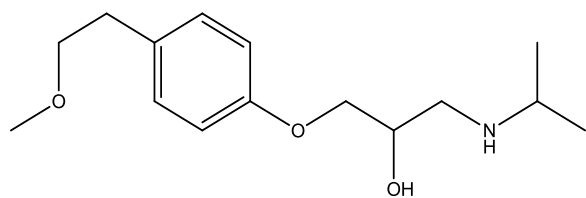
морицизин



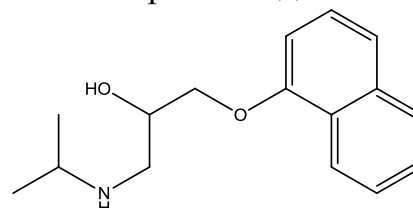
пропафенон



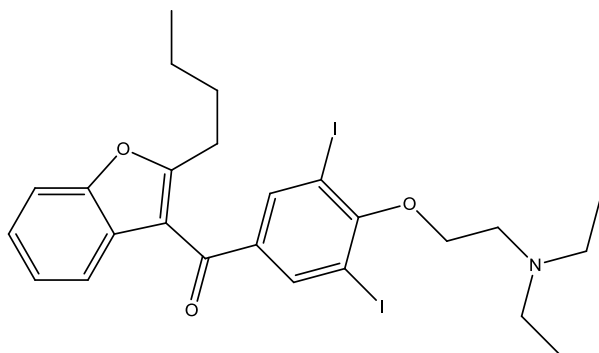
флекаинид



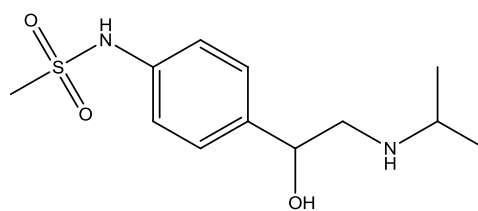
метопролол



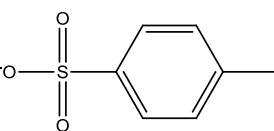
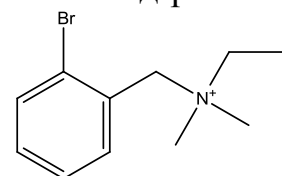
пропранолол



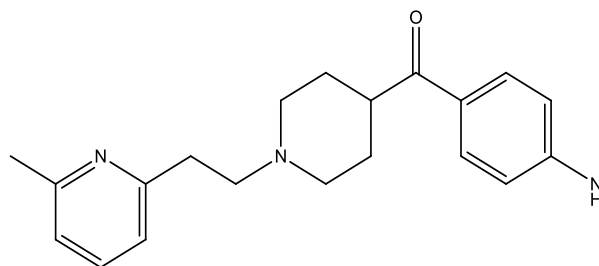
амиодарон



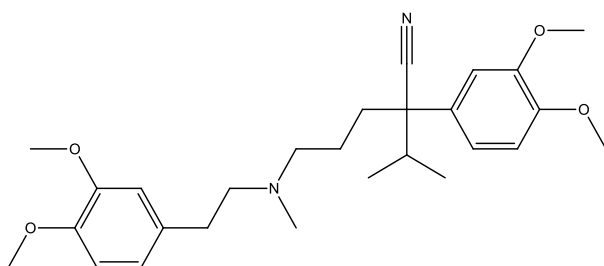
соталол



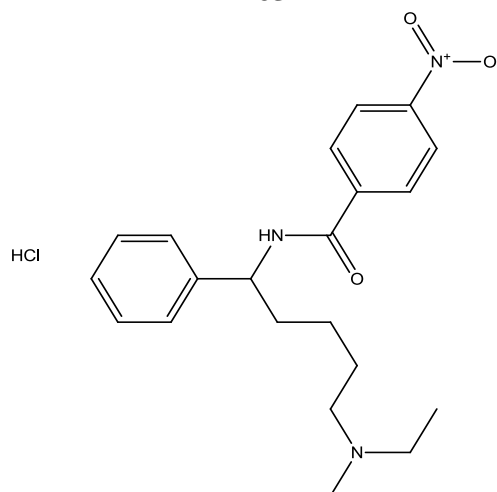
бретилия тозилат



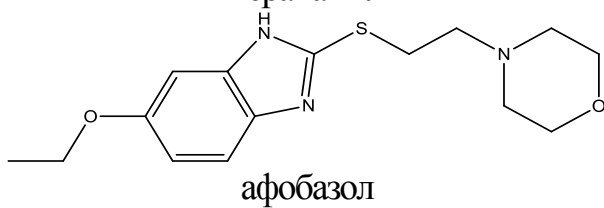
Е-4031



верапамил



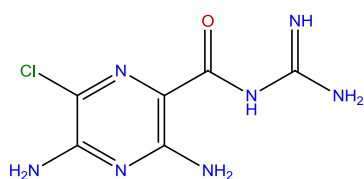
нибентан



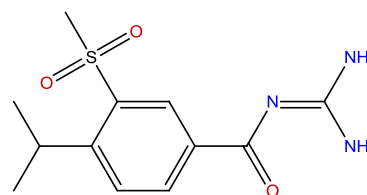
афобазол



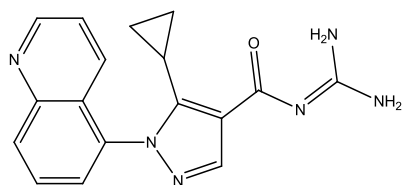
Препараты-стандарты NHE-ингибирующей активности для проведения прогноза в ИТ  
Микрокосм методом сходства к эталонам.



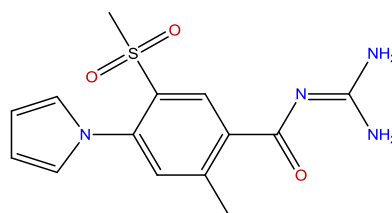
амилорид



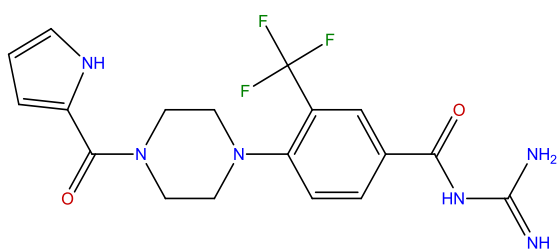
карипорид



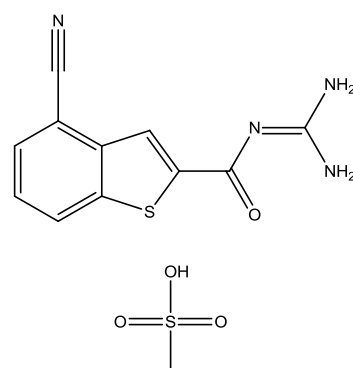
зонипорид



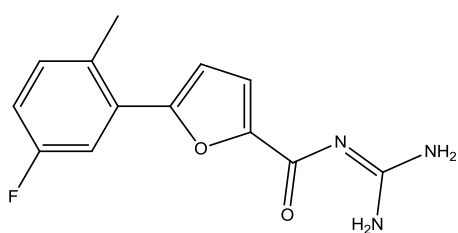
энипорид



сабипорид

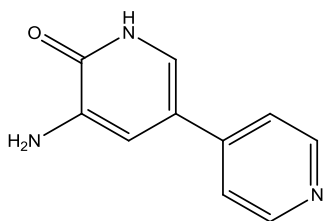


CHEMBL371454

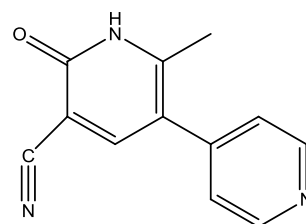


KR-32568

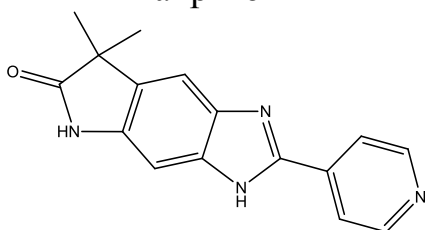
Препараты-стандарты антифосфодиэстеразной активности для проведения прогноза в ИТ Микрокосм методом сходства к эталонам.



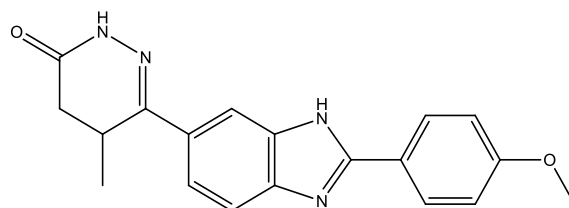
амринон



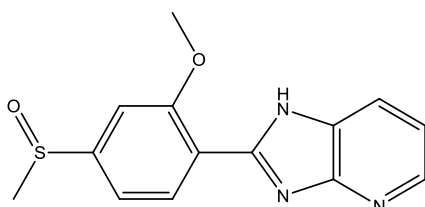
милринон



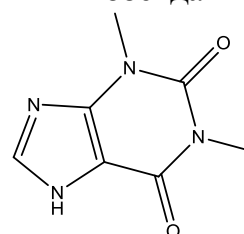
адибендан



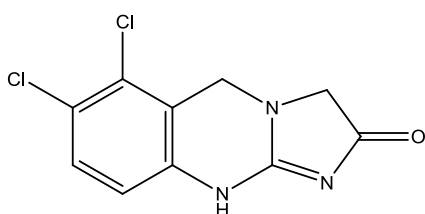
пимобендан



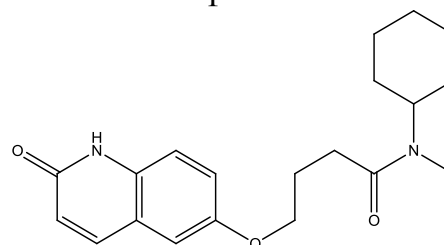
сульмазол



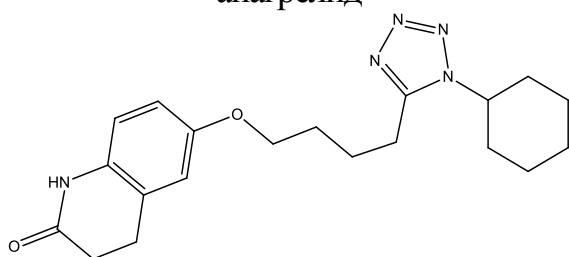
теофиллин



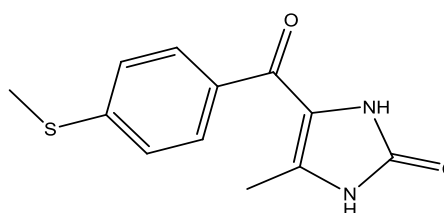
анагрелид



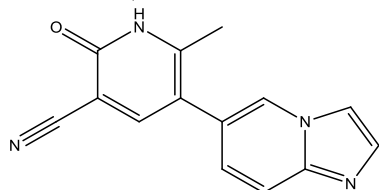
цилостамид



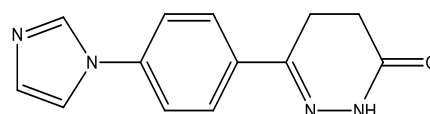
цилостазол



ЭНОКСИМОН



олпринон



имазодан

## Взаимное сходство соединений-стандартов – референсных антиаритмических препаратов

Шифр	Афобазол	Амиодарон	Бретилия тозилат	Е 4031	Флекаинид	Лидокаин	Метопролол	Морицизин	Нибентан	Прокаинамид	Пропафенон	Пропранолол	Хинидин	Соталол	Верапамил
Афобазол		0,1243	0,1483	0,2119	0,2280	0,2375	0,2277	0,3611	0,1523	0,2027	0,1591	0,2247	0,1408	0,1534	0,1333
Амиодарон	0,1243		0,0745	0,1622	0,1646	0,1157	0,0995	0,1690	0,1442	0,1315	0,2034	0,1478	0,1795	0,0627	0,1857
Бретилия тозилат	0,1483	0,0745		0,1931	0,1251	0,2241	0,1577	0,1360	0,1919	0,1736	0,1348	0,1470	0,0658	0,2376	0,1332
Е 4031	0,2119	0,1622	0,1931		0,2855	0,2566	0,1348	0,2651	0,3864	0,3038	0,3113	0,1892	0,2042	0,2160	0,2499
Флекаинид	0,2280	0,1646	0,1251	0,2855		0,2456	0,2007	0,2480	0,3314	0,4148	0,3025	0,2981	0,1364	0,1709	0,1348
Лидокаин	0,2375	0,1157	0,2241	0,2566	0,2456		0,2026	0,2837	0,2606	0,4273	0,2036	0,2134	0,0934	0,2695	0,1542
Метопролол	0,2277	0,0995	0,1577	0,1348	0,2007	0,2026		0,1459	0,1719	0,2076	0,3183	0,3374	0,0996	0,4399	0,1370
Морицизин	0,3611	0,1690	0,1360	0,2651	0,2480	0,2837	0,1459		0,2133	0,2185	0,2060	0,1956	0,1261	0,1453	0,1423
Нибентан	0,1523	0,1442	0,1919	0,3864	0,3314	0,2606	0,1719	0,2133		0,4646	0,3115	0,2412	0,1339	0,2361	0,1987
Прокаинамид	0,2027	0,1315	0,1736	0,3038	0,4148	0,4273	0,2076	0,2185	0,4646		0,2659	0,3044	0,1089	0,2460	0,1132
Пропафенон	0,1591	0,2034	0,1348	0,3113	0,3025	0,2036	0,3183	0,2060	0,3115	0,2659		0,3173	0,1724	0,1986	0,2288
Пропранолол	0,2247	0,1478	0,1470	0,1892	0,2981	0,2134	0,3374	0,1956	0,2412	0,3044	0,3173		0,2201	0,2165	0,1158
Хинидин	0,1408	0,1795	0,0658	0,2042	0,1364	0,0934	0,0996	0,1261	0,1339	0,1089	0,1724	0,2201		0,0957	0,1737
Соталол	0,1534	0,0627	0,2376	0,2160	0,1709	0,2695	0,4399	0,1453	0,2361	0,2460	0,1986	0,2165	0,0957		0,1159
Верапамил	0,1333	0,1857	0,1332	0,2499	0,1348	0,1542	0,1370	0,1423	0,1987	0,1132	0,2288	0,1158	0,1737	0,1159	
Среднее	0,1932	0,1403	0,1531	0,2407	0,2347	0,2277	0,2058	0,2040	0,2456	0,2559	0,2381	0,2263	0,1393	0,2003	0,1583

Средний коэффициент сходства рассчитывался без учета сходства соединения к самому себе: в этом случае ОКС=1, чему соответствуют пустые клетки в таблице. В соответствии с этим:

$\text{ОКС} \geq 0,2559$  – SI=3;  $0,2559 < \text{ОКС} \leq 0,2042$  – SI=2;  $0,2042 < \text{ОКС} \leq 0,1393$  – SI=1

где ОКС - общий коэффициент сходства; SI – индекс сходства.

## Взаимное сходство соединений-стандартов – референсных NHE-1 ингибиторов

Шифр	Амилорид	Карипорид	Энипорид	Сабипорид	Зонипорид	CHEMBL3714	KR-32568
Амилорид		0,2328	0,2913	0,2304	0,2073	0,1470	0,2348
Карипорид	0,2328		0,4957	0,2592	0,2458	0,2368	0,2878
Энипорид	0,2913	0,4957		0,3000	0,3364	0,2273	0,3867
Сабипорид	0,2304	0,2592	0,3000		0,2823	0,1553	0,2093
Зонипорид	0,2073	0,2458	0,3364	0,2823		0,2127	0,2388
CHEMBL3714	0,1470	0,2368	0,2273	0,1553	0,2127		0,2010
KR-32568	0,2348	0,2878	0,3867	0,2093	0,2388	0,2010	
Среднее	0,2239	0,2930	0,3396	0,2394	0,2539	0,1967	0,2597

Средний коэффициент сходства рассчитывался без учета сходства соединения к самому себе: в этом случае ОКС=1,0000, чему соответствуют пустые клетки в таблице. В соответствии с этим:

$\text{ОКС} \geq 0.3396$  – SI=3;  $0.3396 < \text{ОКС} \leq 0.2580$  – SI=2;  $0.2580 < \text{ОКС} \leq 0.1967$  – SI=1;

где ОКС - общий коэффициент сходства; SI – индекс сходства.

## Взаимное сходство соединений-стандартов – референсных PDE-3 ингибиторов

Шифр	Адибендан	Амринон	Милтринон	Пимобендан	Сульмазол	Анагредид	Цилостамид	Цилостазол	Эноксимон	Имазодан	Олпринон	Теофиллин
Адибендан		0,1869	0,1976	0,3920	0,1940	0,2573	0,2146	0,2618	0,2067	0,3022	0,1814	0,1416
Амринон	0,1869		0,5011	0,1748	0,2446	0,1519	0,3087	0,1753	0,2644	0,2089	0,3344	0,2645
Милтринон	0,1976	0,5011		0,2001	0,2311	0,1375	0,2564	0,1431	0,3162	0,1859	0,6619	0,2460
Пимобендан	0,3920	0,1748	0,2001		0,2878	0,1937	0,2537	0,3156	0,2360	0,4890	0,2591	0,1625
Сульмазол	0,1940	0,2446	0,2311	0,2878		0,1459	0,2310	0,2061	0,2259	0,1384	0,2624	0,2617
Анагредид	0,2573	0,1519	0,1375	0,1937	0,1459		0,2590	0,3354	0,1284	0,2952	0,1408	0,1841
Цилостамид	0,2146	0,3087	0,2564	0,2537	0,2310	0,2590		0,3943	0,2220	0,2506	0,2383	0,2346
Цилостазол	0,2618	0,1753	0,1431	0,3156	0,2061	0,3354	0,3943		0,1596	0,3892	0,1595	0,1787
Эноксимон	0,2067	0,2644	0,3162	0,2360	0,2259	0,1284	0,2220	0,1596		0,2062	0,2881	0,2294
Имазодан	0,3022	0,2089	0,1859	0,4890	0,1384	0,2952	0,2506	0,3892	0,2062		0,2118	0,2119
Олпринон	0,1814	0,3344	0,6619	0,2591	0,2624	0,1408	0,2383	0,1595	0,2881	0,2118		0,3072
Теофиллин	0,1416	0,2645	0,2460	0,1625	0,2617	0,1841	0,2346	0,1787	0,2294	0,2119	0,3072	
Среднее	0,2306	0,2560	0,2797	0,2695	0,2208	0,2027	0,2603	0,2471	0,2257	0,2627	0,2768	0,2202

Средний коэффициент сходства рассчитывался без учета сходства соединения к самому себе: в этом случае ОКС=1, чему соответствуют пустые клетки в таблице. В соответствии с этим:

$\text{ОКС} \geq 0,2797$  SI=3;  $0,2797 < \text{ОКС} \leq 0,2460$  SI=2;  $0,2460 < \text{ОКС} \leq 0,2027$  SI=1

где ОКС - общий коэффициент сходства; SI – индекс сходства.

**Пример прогноза в ИТ Микрокосм по нормальной стратегии высокой  
антиаритмической активности среди производных конденсированных и  
неконденсированных бензимидазолов (метод Байеса)**

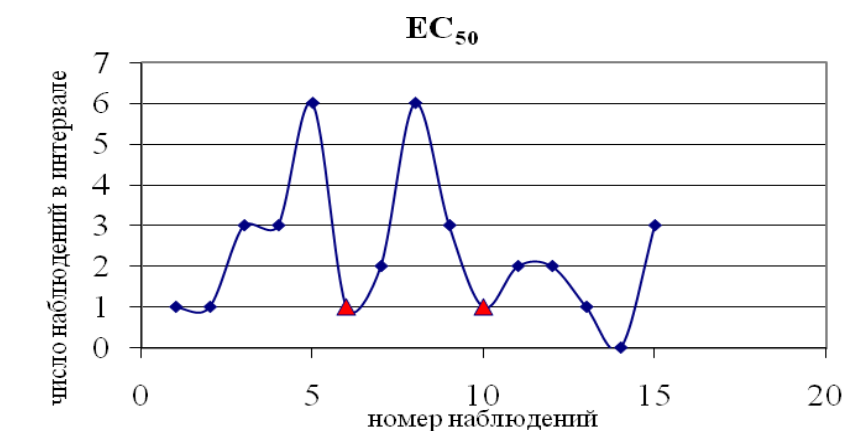
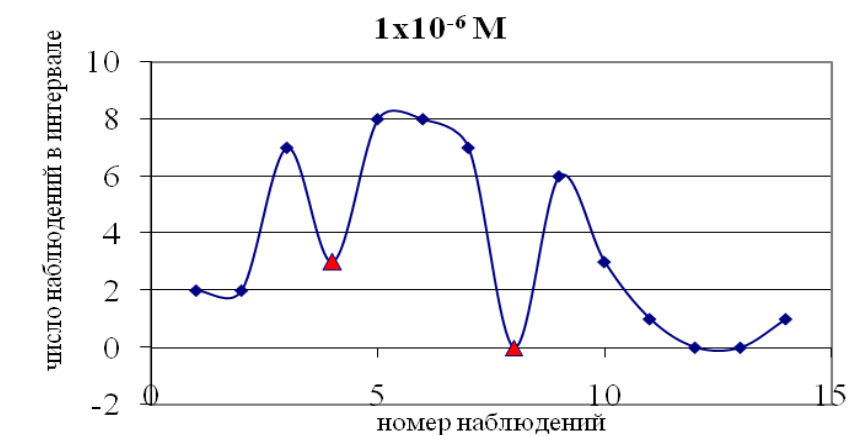
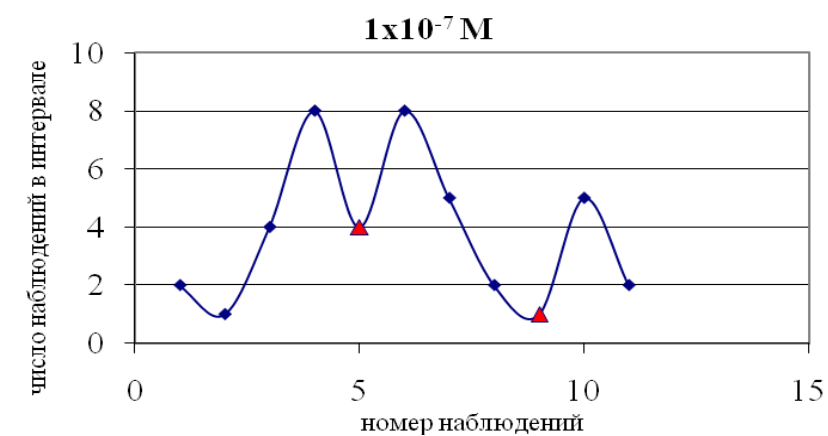
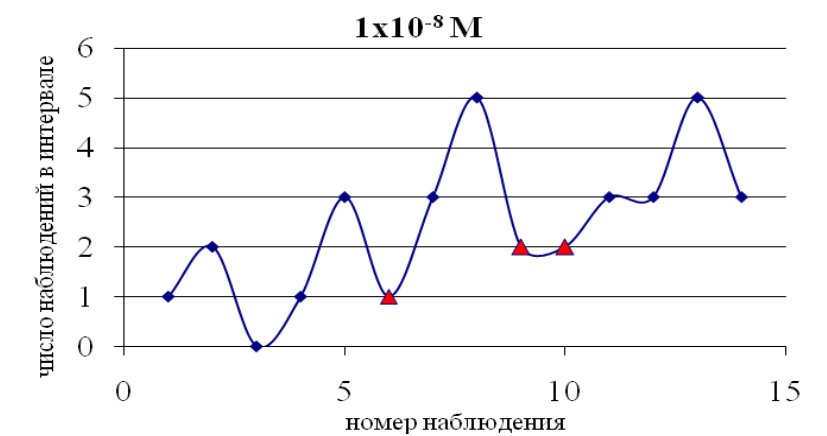
№	Шифр	И <sup>1</sup>	Ро <sup>2</sup>	Расчетные оценки										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	РУ-18	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2.	РУ-212	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3.	РУ-216	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4.	РУ-261	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5.	РУ-262	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
6.	РУ-446	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
7.	РУ-451	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
8.	РУ-476	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
9.	РУ-639	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10.	РУ-641	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
11.	РУ-691	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
12.	РУ-692	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13.	РУ-694	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
14.	РУ-702	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
15.	РУ-704	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
16.	РУ-708	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17.	РУ-709	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
18.	РУ-710	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
19.	РУ-712	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
20.	РУ-835	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
21.	РУ-879	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
22.	РУ-880	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
23.	РУ-882	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
24.	РУ-883	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25.	РУ-1201	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
26.	РУ-1202	A	0,99995	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
27.	РУ-526	A	0,97074	A	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A
28.	РУ-1255	A	0,94417	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A
29.	РУ-1256	A	0,94417	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A
30.	РУ-563	A	0,92065	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
31.	РУ-711	A	0,92065	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
32.	РУ-527	A	0,89143	N	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A
33.	РУ-279	A	0,87409	A	N	A	A	A	A	N	A	A	A	A
34.	РУ-1204	A	0,82651	N	A	A	N	A	A	A	A	A	A	A
35.	РУ-1203	A	0,63177	N	A	A	N	A	N	A	A	N	A	A

<sup>1</sup> И - вычислительная оценка; А наличие, N -отсутствие активности.

<sup>2</sup> Ро - итоговая функция принадлежности к классу высокоактивных соединений

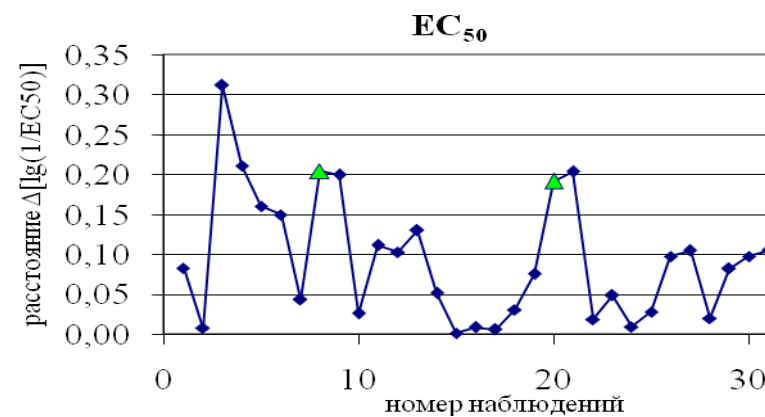
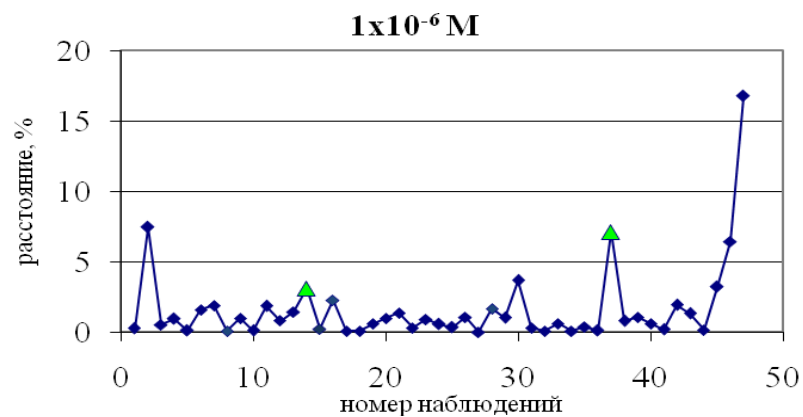
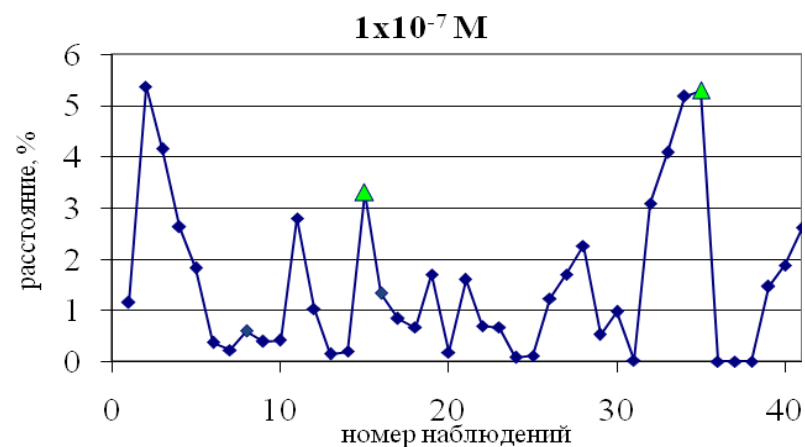
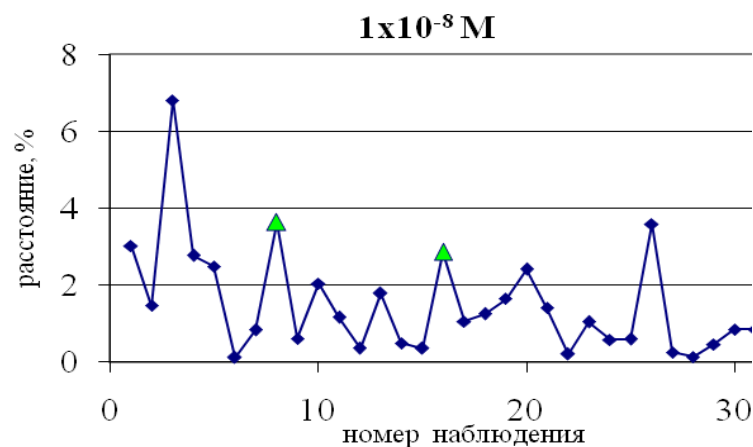
Оценка перспективности базовых структур производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием средних и супремальных оценок уровня антиаритмической активности

№	Химический класс	n	Средняя оценка МЭК		Максимальная оценка МЭК	
			М	log	М	log
1	2,3-дигидро-N <sup>1</sup> -бензимидазолы	29	1,01x10 <sup>-3</sup>	2,9970	4,60x10 <sup>-5</sup>	4,3372
2	N <sup>1</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i> ] бензимидазолы	14	1,69x10 <sup>-3</sup>	2,7717	6,00x10 <sup>-5</sup>	4,2218
3	Бензимидазолы	72	2,07x10 <sup>-3</sup>	2,6838	3,00x10 <sup>-5</sup>	4,5229
4	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	38	2,29x10 <sup>-4</sup>	3,6399	1,30x10 <sup>-5</sup>	4,8861
5	N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2- <i>a</i> ] бензимидазолы	23	3,70x10 <sup>-3</sup>	2,4316	3,00x10 <sup>-5</sup>	4,5229
6	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	230	7,47x10 <sup>-4</sup>	3,1269	1,00x10 <sup>-5</sup>	5,0000
7	N <sup>4</sup> -пиразоло[1,5- <i>a</i> ]бензимидазолы	24	3,73x10 <sup>-4</sup>	3,4280	2,35x10 <sup>-5</sup>	4,6289
9	Пиримидо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	18	2,53x10 <sup>-3</sup>	2,5967	3,00x10 <sup>-5</sup>	4,5229
10	Пирроло[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	27	4,94x10 <sup>-4</sup>	3,3060	1,27x10 <sup>-4</sup>	3,8962



*Приложение 11А.* Определение вероятностным методом кластерного анализа границ классов NHE-ингибирующей активности *in vitro* среди производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов. Гистограммы значений с оптимальным числом интервалов.





*Приложение 11Б.* Определение геометрическим методом кластерного анализа границ классов ННЕ-ингибирующей активности *in vitro* среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола. Графики расстояний между соседями в упорядоченном ряду значений активности.

Оценка перспективности химических базовых структур производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов с использованием средних и супремальных оценок уровня НН-ингибирующей активности

№	Химический класс	n	Средняя оценка				Максимальная оценка			
			% ингибирования в концентрации (М)			log [1/IC <sub>50</sub> ]	% ингибирования в концентрации (М)			log [1/IC <sub>50</sub> ]
			1x10 <sup>-8</sup>	1x10 <sup>-7</sup>	1x10 <sup>-6</sup>		1x10 <sup>-8</sup>	1x10 <sup>-7</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	
1	N <sup>9</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	27	45,94	46,17	51,93	6,64	62,66	80,88	83,79	8,86
2	N <sup>9</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	3	26,91	-	39,59	-	28,64	-	45,87	-
3	N <sup>1</sup> -имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	10	41,96	45,14	55,35	6,63	52,22	64,54	72,86	7,47
4	N <sup>1</sup> -2,3-дигидроимидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы	3	43,48	48,50	60,77	6,83	46,06	49,90	67,11	6,93
5	Все имидазо[1,2- <i>a</i> ]бензимидазолы <sup>1</sup>	43	42,84	46,12	52,49	6,65	62,66	80,88	83,79	8,86
6	N <sup>1</sup> -замещенные аминобензимидазолы	2- 15	45,55	57,71	66,44	7,45	73,95	79,72	83,53	9,27

<sup>1</sup> - обобщенное, включает предыдущие N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы, N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, N<sup>1</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазолы

Изменение показателей кардиодинамики у интактных животных в условиях нагрузки объемом<sup>1</sup> (M±m)

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, <i>мм рт. ст.</i>	85,38± 4,16	99,76± 10,36	106,07± 3,79 <sup>&amp;</sup>	110,79± 9,61 <sup>&amp;</sup>	101,33± 9,54	94,16± 9,17	90,46± 6,52
2.	Скорость сокращения, <i>мм рт. ст./сек</i>	3462,70± 250,62	3815,41± 220,01	3978,86± 213,93	4051,66± 229,53	3796,09± 247,69	3619,69± 199,78	3523,01± 236,12
3.	Скорость расслабления, <i>мм рт. ст./сек</i>	2728,45± 132,05	3065,58± 157,25	3131,85± 188,35	3428,55± 137,09 <sup>&amp;</sup>	3188,45± 184,50 <sup>&amp;</sup>	3056,10± 224,16	2836,09± 221,00
5.	ЧСС, <i>уд/мин</i>	374,83± 10,61	362,00± 19,63	364,83± 20,29	370,67± 20,66	378,17± 7,91	383,50± 8,59	406,33± 20,42
6.	ИФС, <i>мм рт. ст. x ЧСС/г</i>	50260,76± 4761,76	57002,10± 8019,24	59806,58± 4069,79	63658,00± 4657,28 <sup>&amp;</sup>	59666,24± 4920,22	56729,62± 5932,99	58360,10± 7102,68

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили физиологический раствор NaCl из расчета 0,1 мл на 100 г веса в сутки в течение 31 дня.

**Изменение показателей кардиодинамики у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> в условиях нагрузки объемом (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, <i>мм рт. ст.</i>	90,52± 6,95	91,10± 4,28	91,57± 6,15	84,94± 7,30*	83,75± 8,23	84,86± 7,79	81,34± 7,23
2.	Скорость сокращения, <i>мм рт. ст./сек</i>	3146,08± 251,52	3134,57± 174,80*	3155,36± 184,21*	3224,16± 195,29*	3044,66± 205,99*	3101,45± 237,92	3118,52± 210,77
3.	Скорость расслабления, <i>мм рт. ст./сек</i>	2876,00± 165,33	2846,63± 140,49	2919,55± 142,93	2945,13± 102,40*	2793,29± 143,85	2802,82± 170,12	2821,69± 170,88
5.	ЧСС, <i>уд/мин</i>	329,83± 7,03*	304,50± 18,21*	329,33± 11,84	338,50± 12,38	342,33± 8,43*	344,00± 14,15*	340,33± 13,81*
6.	ИФС, <i>мм рт. ст. x ЧСС/г</i>	35387,12± 4933,35*	32653,14± 3659,04*	35774,25± 4664,69*	34027,15± 4706,06*	33962,99± 5117,09*	34644,93± 5230,76*	33131,17± 5259,76*

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: \* - группе интактных животных (приложение 13) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	91,01± 7,95	92,96± 8,47	102,67± 6,59	104,72± 6,56 <sup>#</sup>	96,48± 4,14	89,97± 5,32	88,49± 6,42
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3539,63± 558,41	3787,82± 727,79	3871,75± 579,52	4055,52± 715,09	3482,09± 592,13	3255,65± 484,05	3189,99± 440,54
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	3364,20± 588,44	3289,02± 567,37	3414,64± 576,91	3529,35± 554,41	3176,56± 425,31	3073,13± 442,12	2965,48± 439,55
5.	ЧСС, уд/мин	344,60± 13,68	333,60± 17,66	342,40± 14,00	347,60± 15,79	349,60± 15,65	334,00± 12,99 <sup>*</sup>	334,60± 10,87 <sup>*</sup>
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	39070,96± 6220,35	38903,86± 6791,21	43299,30± 5481,35 <sup>*</sup>	45033,48± 6063,37 <sup>*</sup>	41652,69± 5069,35 <sup>*</sup>	36903,96± 4139,63 <sup>*</sup>	36709,15± 5060,01 <sup>*</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 13); <sup>#</sup> - группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 14) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно ввели изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние соединения РУ-1355 в дозе 5 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	87,34± 5,04	94,79± 6,92	98,46± 6,99	102,70± 6,92	98,01± 6,22	97,09± 6,80	94,69± 7,40
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3698,69± 344,30	3903,90± 282,79	3908,22± 373,73	4126,48± 405,97	3782,98± 188,44 <sup>#</sup>	3782,11± 330,01	3715,93± 371,44
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	3056,38± 170,82	3220,47± 158,46	3540,20± 287,59	3821,45± 295,29 <sup>#</sup>	3461,87± 176,52 <sup>#</sup>	3383,48± 186,97 <sup>#</sup>	3278,34± 135,51
5.	ЧСС, уд/мин	357,50± 21,22	351,75± 20,96	366,75± 19,92	380,25± 27,18	380,75± 25,97	380,25± 24,17	372,75± 16,70
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	37551,28± 4461,85	39806,76± 4252,27	43459,44± 5607,33 <sup>*</sup>	46892,26± 5901,33 <sup>*</sup>	44727,96± 3338,88 <sup>*</sup>	44349,26± 5670,16	42630,42± 6017,92

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 13); <sup>#</sup> - группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 14) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).  
Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно водили изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние предуктала в дозе 25 мг/кг/сутки при курсовом перорального введения на показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, <i>мм рт. ст.</i>	106,91± 8,25*	110,50± 7,73 <sup>#</sup>	116,20± 7,39 <sup>#</sup>	116,64± 7,93 <sup>#</sup>	112,84± 8,30 <sup>#</sup>	112,80± 8,72 <sup>#</sup>	109,45± 7,41 <sup>#</sup>
2.	Скорость сокращения, <i>мм рт. ст./сек</i>	3833,78± 317,99	3770,04± 251,53 <sup>#</sup>	4010,51± 249,45 <sup>#</sup>	3868,95± 306,56	3819,12± 283,48 <sup>#</sup>	3527,46± 434,95	3571,32± 421,66
3.	Скорость расслабления, <i>мм рт. ст./сек</i>	3415,00± 297,96*	3539,78± 181,47 <sup>#</sup>	3675,01± 108,83 <sup>*#</sup>	3645,56± 185,78 <sup>#</sup>	3518,37± 140,39 <sup>#</sup>	3372,39± 375,67	3441,97± 222,35 <sup>#</sup>
5.	ЧСС, <i>уд/мин</i>	330,00± 26,97	325,20± 28,13	325,00± 26,54	330,40± 24,41	350,00± 24,37	351,20± 24,25*	349,60± 23,50*
6.	ИФС, <i>мм рт. ст. x ЧСС/г</i>	45764,01± 3173,75	46659,59± 3680,67 <sup>#</sup>	48978,58± 2746,99 <sup>*#</sup>	50104,83± 3166,09 <sup>*#</sup>	51741,55± 5136,35 <sup>#</sup>	51834,52± 5092,59 <sup>#</sup>	50154,94± 4703,25 <sup>#</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: \* - группе интактных животных (приложение 13); <sup>#</sup> - группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 14) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).  
Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние милдроната в дозе 50 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1.	Левожелудочковое давление, <i>мм рт. ст.</i>	81,09± 3,92	88,62± 3,93	93,74± 3,82	96,97± 4,10 <sup>&amp;</sup>	91,19± 3,62	88,60± 3,30	83,24± 1,99
2.	Скорость сокращения, <i>мм рт. ст./сек</i>	3698,24± 423,89	4050,86± 601,97	4313,74± 499,54	4394,57± 540,27	4422,02± 439,41 <sup>#</sup>	3955,90± 407,75	3807,67± 315,67
3.	Скорость расслабления, <i>мм рт. ст./сек</i>	3098,08± 256,31	3182,66± 223,37	3289,79± 342,03	3300,08± 344,19	3389,41± 307,32	3368,26± 272,60	3061,89± 180,03
5.	ЧСС, <i>уд/мин</i>	338,75± 24,98	340,25± 24,81	341,50± 25,85	342,75± 26,70	340,50± 28,58	344,25± 27,28	343,50± 30,74
6.	ИФС, <i>мм рт. ст. x ЧСС/г</i>	39063,29± 1245,53 <sup>*</sup>	42874,34± 992,27 <sup>#</sup>	45507,19± 937,64 <sup>*&amp;</sup>	47250,80± 1507,06 <sup>*#&amp;</sup>	44055,73± 997,45 <sup>*&amp;</sup>	43330,03± 818,02 <sup>*&amp;</sup>	40667,74± 1821,26 <sup>*</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 13); <sup>#</sup> - группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 14) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05); различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмена с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно ввели изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.



Изменение показателей кардиодинамики у интактных животных в условиях изометрической нагрузки<sup>1</sup> (M±m)

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, <i>мм рт. ст.</i>	91,17± 4,78	172,58± 7,98 <sup>&amp;</sup>	169,38± 8,32 <sup>&amp;</sup>	165,35± 8,59 <sup>&amp;</sup>	161,50± 8,10 <sup>&amp;</sup>	162,07± 9,08 <sup>&amp;</sup>	90,40± 5,81
2.	Скорость сокращения, <i>мм рт. ст./сек</i>	3885,88± 231,74	5769,83± 322,15 <sup>&amp;</sup>	5480,05± 263,43 <sup>&amp;</sup>	5132,81± 262,07 <sup>&amp;</sup>	5034,67± 279,66 <sup>&amp;</sup>	5053,15± 277,03 <sup>&amp;</sup>	3581,01± 237,83
3.	Скорость расслабления, <i>мм рт. ст./сек</i>	3153,35± 194,89	4028,54± 164,03 <sup>&amp;</sup>	4070,94± 252,41 <sup>&amp;</sup>	3898,55± 163,47 <sup>&amp;</sup>	3898,31± 246,36 <sup>&amp;</sup>	3978,73± 263,55 <sup>&amp;</sup>	3038,66± 135,78
5.	ЧСС, <i>уд/мин</i>	377,89± 8,87	423,78± 24,51	417,33± 27,05	431,67± 24,71 <sup>&amp;</sup>	430,89± 16,79 <sup>&amp;</sup>	443,86± 14,34 <sup>&amp;</sup>	351,67± 27,82
6.	ИФС, <i>мм рт. ст. x ЧСС/г</i>	53550,76± 4290,44	112975,05± 9727,55 <sup>&amp;</sup>	108213,70± 8235,21 <sup>&amp;</sup>	108369,15± 6030,22 <sup>&amp;</sup>	106415,28± 5693,54 <sup>&amp;</sup>	109935,01± 5806,56 <sup>&amp;</sup>	49366,43± 5616,88

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили физиологический раствор NaCl из расчета 0,1 мл на 100 г веса в сутки в течение 31 дня.

**Изменение показателей кардиодинамики у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> в условиях изометрической нагрузки (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			ОККЛЮЗИЯ					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	92,25± 6,74	148,71± 14,25 <sup>&amp;</sup>	141,37± 2,09 <sup>*&amp;</sup>	137,44± 14,69 <sup>&amp;</sup>	138,82± 11,63 <sup>&amp;</sup>	134,08± 3,33 <sup>*&amp;</sup>	92,31± 7,03
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3266,19± 267,25	4376,32± 578,19 <sup>*</sup>	3955,50± 446,20 <sup>*</sup>	3721,48± 416,03 <sup>*</sup>	3900,40± 427,95 <sup>*</sup>	3749,46± 422,97 <sup>*</sup>	2966,51± 220,31
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2990,10± 177,77	3582,47± 267,45	3370,43± 155,97 <sup>*</sup>	3207,72± 165,18 <sup>*</sup>	3384,66± 202,80	3518,44± 309,74	2884,56± 185,25
5.	ЧСС, уд/мин	334,50± 16,31 <sup>*</sup>	383,00± 22,74	402,83± 26,29 <sup>&amp;</sup>	403,17± 29,96 <sup>&amp;</sup>	432,33± 32,34 <sup>&amp;</sup>	443,17± 32,23 <sup>&amp;</sup>	342,33± 22,55
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	36927,44± 5342,05 <sup>*</sup>	69071,83± 11413,54 <sup>*&amp;</sup>	68476,54± 10390,39 <sup>*&amp;</sup>	65362,53± 9423,61 <sup>*&amp;</sup>	70557,26± 9110,44 <sup>*&amp;</sup>	70164,79± 9579,28 <sup>*&amp;</sup>	38344,97± 5467,53

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 19) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние соединения РУ-1355 в дозе 1,25 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях изометрической нагрузки у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			Окклюзия, сек.					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	88,31± 9,81	145,35± 13,44 <sup>&amp;</sup>	144,20± 11,40 <sup>&amp;</sup>	146,31± 9,86 <sup>&amp;</sup>	144,42± 8,21 <sup>&amp;</sup>	144,47± 10,87 <sup>&amp;</sup>	105,22± 8,41
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3066,14± 367,84	4094,14± 471,03 <sup>*</sup>	3862,91± 252,42 <sup>*</sup>	3900,03± 279,05 <sup>*</sup>	4162,25± 460,36	4192,19± 498,34	3831,23± 629,00 <sup>*</sup>
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2917,67± 254,29	3133,06± 141,91 <sup>*</sup>	3218,36± 254,20 <sup>*</sup>	3393,19± 310,12	3698,18± 302,76	3630,86± 351,58	3813,56± 702,22
5.	ЧСС, уд/мин	341,00± 24,07	381,00± 16,72	416,25± 20,24	438,00± 17,88 <sup>&amp;</sup>	477,00± 23,18 <sup>&amp;</sup>	488,25± 24,16 <sup>&amp;</sup>	447,25± 14,86 <sup>&amp;*#</sup>
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	41577,66± 9572,27	73998,68± 10888,08 <sup>*</sup>	79853,35± 10284,16 <sup>&amp;</sup>	85130,80± 10274,00 <sup>&amp;</sup>	92167,26± 12549,88 <sup>&amp;</sup>	94798,33± 14434,78 <sup>&amp;</sup>	63962,42± 11059,10

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); \* - группе интактных животных (приложение 19) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05). Различий статистически достоверных по отношению к: группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 20) не выявлено (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно ввели изопротеренол 2,5 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние соединения РУ-1355 в дозе 5 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях изометрической нагрузки у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			Окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	98,35± 12,72	167,25± 14,18 <sup>&amp;</sup>	156,48± 17,23 <sup>&amp;</sup>	160,31± 20,20 <sup>&amp;</sup>	160,06± 21,93	162,45± 22,38	97,45± 7,05
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3511,24± 429,47	4484,58± 502,66	4687,25± 550,63	4911,99± 691,54	4774,80± 807,05	4961,04± 891,12	3079,17± 220,45
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	3183,05± 250,22	3933,53± 84,18 <sup>&amp;</sup>	3854,87± 219,69	4006,08± 367,61	4061,19± 485,86	3984,77± 449,01	3176,12± 266,45
5.	ЧСС, уд/мин	370,75± 15,33	377,00± 7,58	424,75± 22,23	472,25± 24,69 <sup>&amp;</sup>	483,25± 25,90 <sup>&amp;</sup>	472,25± 21,15 <sup>&amp;</sup>	387,75± 49,85
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	41814,64± 6303,79	72057,69± 6765,03 <sup>*</sup>	76919,13± 12691,82	87190,73± 14318,71 <sup>&amp;</sup>	88927,80± 15176,94 <sup>&amp;</sup>	87469,76± 12848,00 <sup>&amp;</sup>	43051,59± 6755,63

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ); \* - группе интактных животных (приложение 19) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 20) не выявлено (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно ввели изопротеренол 1,25 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние предуктала в дозе 25 мг/кг при курсовом пероральном введении на показатели кардиодинамики в условиях изометрической нагрузки у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	108,38± 5,24*	182,93± 11,49 <sup>&amp;</sup>	172,09± 11,56 <sup>&amp;</sup>	167,95± 10,82 <sup>&amp;</sup>	168,84± 11,83 <sup>&amp;</sup>	171,51± 12,30 <sup>&amp;#</sup>	112,84± 8,09*
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3692,99± 223,89	5279,51± 264,97 <sup>&amp;</sup>	4872,03± 271,94 <sup>&amp;</sup>	4702,64± 308,71 <sup>&amp;</sup>	4834,26± 385,54 <sup>&amp;</sup>	4860,76± 413,25 <sup>&amp;</sup>	3813,12± 218,49 <sup>#</sup>
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	3420,10± 148,59	4168,24± 182,68 <sup>&amp;</sup>	4209,67± 229,19 <sup>&amp;#</sup>	4230,61± 303,10 <sup>&amp;#</sup>	4336,73± 338,78 <sup>&amp;#</sup>	4373,65± 376,95 <sup>&amp;</sup>	3427,94± 275,16
5.	ЧСС, уд/мин	327,67± 13,14*	415,83± 26,98 <sup>&amp;</sup>	425,83± 17,91 <sup>&amp;</sup>	423,50± 27,18 <sup>&amp;</sup>	445,33± 20,36 <sup>&amp;</sup>	430,00± 31,62 <sup>&amp;</sup>	400,83± 40,11
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/2	46188,25± 2245,59	99528,70± 9728,26 <sup>&amp;#</sup>	97188,34± 10968,08 <sup>&amp;</sup>	94053,47± 10833,70 <sup>&amp;#</sup>	98368,33± 8552,06 <sup>&amp;#</sup>	97128,86± 11205,90 <sup>&amp;</sup>	59071,96± 7637,40 <sup>#</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); \* - группе интактных животных (приложение 19), <sup>#</sup> - группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 20) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Внутривенно вводили изопротеренон 1,25 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние милдроната в дозе 50 мг/кг при курсовом внутрибрюшинном введении на показатели кардиодинамики в условиях изометрической нагрузки у животных с хронической интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			окклюзия					реперфузия
			5	10	15	20	25	
1.	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	86,58± 6,60	146,81± 12,68 <sup>&amp;</sup>	131,07± 9,19 <sup>*&amp;</sup>	133,25± 9,63 <sup>*&amp;</sup>	132,33± 11,69 <sup>*&amp;</sup>	132,71± 15,48 <sup>&amp;</sup>	92,38± 5,83
2.	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3681,25± 556,54	4762,97± 831,85	3909,87± 585,18 <sup>*</sup>	3876,18± 618,98	4031,16± 694,61	4218,68± 838,34	3635,16± 542,24
3.	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	3062,05± 330,94	3252,19± 201,62 <sup>*</sup>	3153,28± 156,41 <sup>*</sup>	3068,35± 171,19 <sup>*</sup>	3168,07± 223,04 <sup>*</sup>	3244,80± 277,84	2978,77± 332,78
5.	ЧСС, уд/мин	368,50± 35,30	380,05± 46,11	419,17± 33,44	437,50± 33,25	448,00± 34,98	435,64± 36,12	410,67± 30,93
6.	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	46513,05± 5979,80	80305,43± 11352,79 <sup>*&amp;</sup>	79916,38± 8332,01 <sup>*&amp;</sup>	84866,69± 8696,17 <sup>*&amp;</sup>	87402,11± 12054,13 <sup>&amp;</sup>	85626,14± 14574,63 <sup>&amp;</sup>	55686,78± 6094,31 <sup>#</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ); <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 19) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: группе животных с хронической изопротереноловой интоксикацией (приложение 20) не выявлено (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup> Внутрибрюшинно водили изопротеренол 1,25 мг/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней.

**Влияние амфедазола и амиодарона на течение экспериментальной ишемии миокарда наркотизированных кошек в условиях регулируемой окклюзии левой нисходящей ветви коронарной артерии по данным динамики подъема сегмента ST эпикардиальной электрограммы (в  $\Delta$  % к исходным данным)**

№	Вещество	n	Скорость введения вещества, мг/кг/мин	Время введения вещества, минуты			
				1	5	7	10
1.	Физиологический раствор	5	0,1 мл на 100 г веса животного	2,80±1,54	3,86±0,74	4,02±2,90	3,45±2,14
2.	Амфедазол	5	0,15	-3,48±1,51	-20,12±2,13 <sup>*#</sup>	-16,89±4,77 <sup>*#</sup>	-17,65±4,43 <sup>*#</sup>
3.		5	0,3	-11,32±6,68	-21,98±5,15 <sup>*#</sup>	-40,65±5,35 <sup>*#</sup>	-31,61±13,68 <sup>*#</sup>
4.	Амиодарон	5	5,0	-8,78±5,17	-40,93±7,26 <sup>*#</sup>	-41,58±10,23 <sup>*#</sup>	-41,65±13,75 <sup>*#</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - исходу в своей группе (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ); <sup>#</sup> - группе контрольных животных (получавших физ. раствор) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ).

**Изменение показателей кардио- и гемодинамики в условиях нагрузки объемом у интактных животных (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	70,37±5,24	77,45±6,87	81,82±4,14	89,48±4,84 <sup>\$</sup>	86,53±3,86 <sup>\$</sup>	83,88±11,96	79,47±10,16
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2883,79±397,87	3100,55±429,79	3214,55±473,99	3339,45±473,99	3264,66±443,96	3201,13±486,94	3012,92±433,59
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2561,62±260,07	2718,68±304,50	2909,92±393,00	3121,41±374,24	2993,25±402,93	2887,87±374,56	2663,40±292,34
4	АД систолическое, мм рт. ст.	75,94±15,70	83,68±16,52	87,04±18,67	89,96±17,40	87,66±17,03	86,30±16,84	86,36±18,10
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	60,04±15,54	67,74±16,11	70,16±18,88	72,28±17,60	71,24±16,58	69,96±16,78	70,00±18,37
6	АД среднее, мм рт. ст.	68,40±5,85	75,34±6,58	78,92±2,10 <sup>\$</sup>	82,22±7,68 <sup>\$</sup>	79,34±3,52 <sup>\$</sup>	78,76±8,57	78,60±8,57
7	ЧСС, уд/мин	344,17±21,73	332,83±18,02	345,00±18,64	337,30±22,56	337,17±23,13	345,33±17,39	345,17±17,89
8	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	56558,68±10042,82	59646,58±9261,89	65404,45±10951,13	70788,56±13868,47	68308,79±13530,19	67806,14±12859,94	63486,82±9807,63

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).



**Изменение показателей кардио- и гемодинамики у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> в условиях нагрузки объемом (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	71,20±6,60	65,82±6,66	67,80±6,19*	74,10±4,91*	70,60±5,1	67,67±6,41	66,75±6,42
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3329,80±501,91	3217,17±479,67	3287,05±504,79	3483,73±517,99	3364,55±530,47	3308,90±538,89	3203,37±500,05
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2723,40±364,71	2659,45±354,81	2735,17±393,78	2784,82±430,49	2858,98±396,84	2684,35±426,35	2748,45±342,09
4	АД систолическое, мм рт. ст.	85,23±12,44	81,35±10,29	83,37±10,21	86,23±9,54	85,22±9,15	82,53±10,20	81,83±9,97
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	69,97±12,66	66,22±10,27	68,25±10,16	72,35±9,59	71,55±9,04	66,92±10,22	66,48±10,05
6	АД среднее, мм рт. ст.	78,92±12,70	74,90±10,35	77,02±10,26	81,18±9,44	78,85±9,34	76,08±10,24	75,37±10,11
7	ЧСС, уд/мин	287,50±17,62*	291,67±15,66*	295,00±15,99*	292,67±18,24	288,67±16,74*	288,67±17,31*	286,17±16,46*
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	37966,24±4674,03	35041,80±3307,33*	36768,71±3699,20*	40154,98±4127,31*	37675,08±3733,51*	35776,79±3570,57*	35039,32±3617,26*

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: \* - группе интактных животных (приложение 26) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние соединения РУ-539 в дозе 0,42 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	79,93±7,09	78,65±6,75	84,00±6,42 <sup>#</sup>	90,58±8,01 <sup>#</sup>	85,93±6,39 <sup>#</sup>	83,60±6,19 <sup>#</sup>	81,35±7,07
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3152,93±310,33	3282,78±455,41	3455,32±368,72	3523,35±349,57	3457,63±482,20	3467,20±215,13	3165,80±308,29
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2599,85±265,09	2480,92±272,42	2702,47±271,58	2879,52±221,17	2544,23±256,52	2632,37±336,81	2688,88±310,38
4	АД систолическое, мм рт. ст.	89,93±15,94	92,33±16,32	95,56±16,28	100,47±16,75	95,98±16,71	93,30±18,86	92,53±16,21
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	71,03±12,54	75,33±14,63	77,28±14,82	80,58±13,52	78,12±14,95	76,67±14,69	74,18±13,04
6	АД среднее, мм рт. ст.	81,50±14,31	84,65±15,51	87,65±15,43	91,58±15,36	88,27±16,29	88,20±15,84	86,00±14,88
7	ЧСС, уд/мин	299,83±24,29	305,00±27,12	305,67±30,99	299,00±28,79	295,83±22,98	315,17±27,43	298,33±28,35
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	40859,15±3513,35	41182,59±4597,84	44151,43±5757,56	46440,59±5862,16	43477,83±3833,11	45803,14±6085,48	41709,80±5387,68 <sup>*</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 26); <sup>#</sup> - группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 27) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Подкожно ввели изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние амринона в дозе 0,94 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в условиях нагрузки объемом у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	72,40±4,98	67,15±7,46	70,68±7,32	79,02±9,35	73,51±7,50	70,42±7,34	67,30±8,01
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2834,15±185,60	2833,18±245,67	2981,73±127,97	3129,88±242,18	2987,60±240,75	2866,43±186,92	2778,95±217,08
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2534,17±76,51	2409,45±70,66	2502,62±92,38	2558,03±84,71	2480,73±191,87	2513,73±117,77	2423,45±121,47
4	АД систолическое, мм рт. ст.	88,13±9,88	84,22±8,85	86,78±8,25	91,42±7,41	90,55±7,42	87,13±7,58	83,70±7,90
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	73,35±6,51	65,67±9,10	69,88±8,34	72,30±8,09	73,53±6,78	71,65±6,34	68,83±6,93
6	АД среднее, мм рт. ст.	80,23±8,21	75,07±7,91	78,73±7,54	82,50±7,19	81,65±6,43	78,54±7,10	75,72±7,25
7	ЧСС, уд/мин	284,17±32,29	259,40±28,45*	259,60±29,86*	265,36±14,21*	264,00±25,34*	254,08±21,31*	252,76±21,65*
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	34218,66±6062,78*	29267,557±6335,13*	30751,62±6639,85*	33307,60±5543,61*	32598,10±6536,61*	30134,50±5847,37*	28254,14±5983,05*

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: \* - группе интактных животных (приложение 26) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ) и группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 27) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ) не выявлено.

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

## Изменение показателей кардио- и гемодинамики в тесте на адренореактивность у интактных животных (М±m)

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	79,12±6,79	91,16±9,54	99,98±4,64 <sup>\$</sup>	109,10±11,71 <sup>\$</sup>	105,68±10,80 <sup>\$</sup>	100,58±11,16	92,54±9,41
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3147,89±308,17	3519,65±446,97	3834,08±368,53 <sup>\$</sup>	4189,92±239,67 <sup>\$</sup>	4038,79±217,33 <sup>\$</sup>	3774,83±592,91	3519,59±450,18
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2877,57±207,07	3043,88±306,86	3548,02±145,43 <sup>\$</sup>	3672,38±249,44 <sup>\$</sup>	3609,80±293,70 <sup>\$</sup>	3497,72±395,75	3080,40±282,88
4	АД систолическое, мм рт. ст.	105,82±9,53	121,88±2,77 <sup>\$</sup>	131,90±4,83 <sup>\$</sup>	140,06±5,65 <sup>\$</sup>	136,08±4,28 <sup>\$</sup>	129,40±13,27	124,66±20,68
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	90,80±9,13	103,16±2,52	115,54±4,75 <sup>\$</sup>	122,64±4,72 <sup>\$</sup>	119,70±4,13 <sup>\$</sup>	112,14±12,99	102,62±21,79
6	АД среднее, мм рт. ст.	100,16±9,17	113,42±2,16	124,40±5,06 <sup>\$</sup>	132,30±5,31 <sup>\$</sup>	129,06±4,30 <sup>\$</sup>	121,76±13,37	114,82±21,62
7	ЧСС, уд/мин	332,40±9,68	345,60±12,30	352,40±5,19	380,20±9,74 <sup>\$</sup>	352,40±6,30	355,82±12,36	351,54±14,65
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	56159,99±1948,52	667781,33±3628,84 <sup>\$</sup>	73886,17±5076,87 <sup>\$</sup>	80922,88±3048,30 <sup>\$</sup>	78685,54±2642,98 <sup>\$</sup>	75666,02±4409,08 <sup>\$</sup>	68978,18±3736,85 <sup>\$</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).

**Изменение показателей кардио- и гемодинамики в тесте на адренореактивность у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	65,01±5,07	65,34±5,84*	72,23±5,55*	80,97±5,90*	77,81±6,91*	73,03±6,08*	67,23±7,55*
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3055,90±391,28	2794,30±322,27	3128,70±347,08	3365,81±408,49	3296,66±369,67	3058,59±364,75	3063,79±384,23
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2581,54±296,71	2617,09±244,09	2679,26±280,32	2846,01±303,36	2825,50±308,19	2748,70±245,74	2593,94±267,77
4	АД систолическое, мм рт. ст.	76,66±9,20	80,73±9,08	84,43±9,74	92,11±10,45	91,93±9,21	87,93±10,21	82,16±10,29
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	62,79±10,35	66,20±11,17	70,44±12,49	79,77±12,69	79,33±11,65	75,09±12,41	68,19±12,56
6	АД среднее, мм рт. ст.	70,04±9,71	74,31±10,01	78,27±10,92	86,79±11,38	86,57±10,23	82,59±11,12	75,87±11,32
7	ЧСС, уд/мин	270,86±8,37*	343,29±28,20 <sup>\$</sup>	374,00±27,48 <sup>\$</sup>	413,86±29,10 <sup>\$</sup>	392,14±29,41 <sup>\$</sup>	370,86±30,54 <sup>\$</sup>	343,14±28,50 <sup>\$</sup>
8	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	32594,18±2035,05*	42895,99±6391,80*	49378,05±6287,95 <sup>\$</sup>	58152,74±6824,85 <sup>\$</sup>	58142,71±7857,65 <sup>\$</sup>	51709,43±7360,43 <sup>\$</sup>	44529,68±7592,03

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - к исходно (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); \* - группе интактных животных (приложение 30) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние соединения РУ-539 в дозе 0,42 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в тесте на адренореактивность у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	67,18±9,26	70,60±7,70	75,10±5,67	81,44±6,88 <sup>\$</sup>	79,30±6,99	74,82±6,78	72,06±7,41
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2852,26±616,95	2839,38±644,32	2790,54±427,53	3192,06±670,16	3114,70±675,21	3020,86±590,71	2855,24±448,20
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2423,94±229,69	2559,12±358,47	2485,72±224,40 <sup>*</sup>	2810,62±307,75	2533,16±207,91 <sup>*</sup>	2570,36±192,22	2465,72±265,66
4	АД систолическое, мм рт. ст.	72,62±9,54	77,24±9,16	82,02±7,28	89,50±7,75	86,86±7,65	81,72±8,57	79,04±9,42
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	59,58±7,03	63,78±7,88	70,94±5,90	78,88±6,25	75,90±5,76	69,20±8,09	67,30±8,09
6	АД среднее, мм рт. ст.	66,88±8,38	71,16±8,27	77,12±6,44	84,14±6,93 <sup>\$</sup>	82,10±6,72 <sup>\$</sup>	75,46±7,82	73,74±8,68
7	ЧСС, уд/мин	327,00±14,18 <sup>#</sup>	361,12±30,13	411,40±16,97 <sup>\$*</sup>	413,80±14,34 <sup>\$</sup>	378,60±31,13	378,00±31,75	367,00±29,96
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	37323,78±5379,36 <sup>*</sup>	43856,48±6534,48 <sup>*</sup>	46510,79±5689,98 <sup>*</sup>	49963,12±5453,15 <sup>*\$</sup>	51001,67±5887,92 <sup>*\$</sup>	48666,06±6845,87 <sup>*</sup>	45496,71±6585,72 <sup>*</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - к исходу (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 30) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05). Различий статистически достоверных по отношению к: группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 31) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p>0,05) не выявлено.

<sup>1</sup> Подкожно водили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние амринона в дозе 0,94 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в тесте на адренореактивность у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели) в течение нагрузки (время наблюдения, секунды)					
			5	10	15	30	45	60
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	69,50±7,68	70,98±7,37	75,78±7,33	82,00±7,92 <sup>*</sup>	79,08±7,69 <sup>*</sup>	77,08±7,57	74,32±6,99
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2914,25±292,96	2838,00±189,88	3015,07±212,97	3239,25±224,71	3213,02±361,96	3052,85±221,04	2929,27±209,24
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2676,08±219,38	2449,58±163,80	2659,90±166,67	2831,43±218,67	2590,60±182,04 <sup>*</sup>	2661,77±174,60	2830,65±261,69
4	АД систолическое, мм рт. ст.	86,03±12,08	79,50±4,68	83,10±7,02	92,50±5,64	88,10±5,87	86,55±7,29	84,20±5,52
5	АД диастолическое, мм рт. ст.	72,38±11,52	69,90±8,56	71,78±8,89	81,68±9,33	74,40±10,55	72,30±10,58	70,15±8,76
6	АД среднее, мм рт. ст.	80,30±11,75	75,05±6,15	77,95±8,02	87,58±7,44	81,95±8,13	80,33±9,15	77,73±7,21
7	ЧСС, уд/мин	271,67±25,06 <sup>*</sup>	283,83±30,29 <sup>*</sup>	304,50±29,47 <sup>#</sup>	333,33±34,26 <sup>#</sup>	314,50±38,21 <sup>#</sup>	310,83±35,90	298,67±33,26
8	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	28973,86±5329,19 <sup>*</sup>	31488,74±6305,26 <sup>*</sup>	33443,43±6426,59 <sup>*</sup>	36128,78±6957,07 <sup>*#</sup>	38931,77±8088,50 <sup>*#</sup>	37310,11±7403,71 <sup>*</sup>	34519,42±6589,31 <sup>*</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 30); <sup>#</sup> - группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 31) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

Различий статистически достоверных по отношению к: «исходу» не выявлено (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p>0,05).

<sup>1</sup> Подкожно водили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Изменение показателей кардио- и гемодинамики в условиях максимальной изометрической нагрузки у интактных животных (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели)					
			Окклюзия, сек.					Реперфузия
			5	10	15	20	25	
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	75,50±6,60	137,58±13,75 <sup>\$</sup>	135,50±13,43 <sup>\$</sup>	131,43±13,77 <sup>\$</sup>	127,47±13,71 <sup>\$</sup>	122,33±15,13 <sup>\$</sup>	113,32±12,99 <sup>\$</sup>
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	3028,71±368,33	3918,31±548,12	3880,74±498,48	3696,13±448,25	3638,06±493,28	3505,78±534,44	3323,61±434,78
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2595,00±224,31	3211,37±335,77	3155,30±358,80	2993,02±343,49	2998,17±340,80	2871,51±345,00	2608,77±294,15
4	ЧСС, уд/мин	334,90±20,41	354,87±52,86	356,82±50,10	346,12±43,13	355,08±55,84	342,83±38,73	321,08±47,31
5	ИФС, мм рт. ст. х ЧСС/г	58164,93±5863,37	111400,76±18313,81 <sup>\$</sup>	110135,30±18038,75 <sup>\$</sup>	103861,09±15781,13 <sup>\$</sup>	104660,43±20559,07 <sup>\$</sup>	95694,66±15060,32 <sup>\$</sup>	85031,01±16994,72 <sup>\$</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).



**Изменение показателей кардио- и гемодинамики у животных с острой интоксикацией изопроterenолом<sup>1</sup> в условиях максимальной изометрической нагрузки (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели)					
			Окклюзия, сек.					Реперфузия
			5	10	15	20	25	
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	72,13±6,05	118,05±11,11 <sup>\$</sup>	107,62±14,41 <sup>\$</sup>	98,92±13,00 <sup>*</sup>	93,98±13,87 <sup>*</sup>	87,72±16,13	86,15±16,44
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2986,90±483,23	3678,45±599,63	3509,85±436,07	3231,88±410,08	3191,00±421,75	2951,67±412,63	2945,88±406,62
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2632,43±264,28	3012,08±232,96	2707,35±302,03	2742,90±258,61	2619,63±235,41	2534,75±340,29	2489,20±295,64
4	ЧСС, уд/мин	293,50±27,68	370,60±74,26	374,80±61,69	387,40±42,69	396,60±36,36	400,00±37,79	393,00±33,74
5	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	39372,26±4654,32 <sup>*</sup>	85344,30±17464,07 <sup>\$</sup>	80494,16±17999,54 <sup>\$</sup>	77002,58±16829,20 <sup>\$</sup>	76062,03±16904,45	73565,58±16703,51	71317,58±16178,20

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - к исходно (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05); <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 34) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопроterenол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние соединения РУ-539 в дозе 0,42 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в условиях максимальной изометрической нагрузки у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели)					
			Окклюзия, сек.					Реперфузия
			5	10	15	20	25	
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	75,68±6,95	130,53±14,97 <sup>\$</sup>	126,63±13,70 <sup>\$</sup>	124,45±14,39 <sup>\$</sup>	121,78±14,35 <sup>\$</sup>	119,85±14,74 <sup>\$</sup>	117,32±14,80 <sup>\$</sup>
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2944,17±483,62	3709,27±525,60	3524,63±458,28	3300,45±495,79	3399,97±442,50	3300,57±379,77	3233,30±332,08
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2563,85±269,76	2922,67±260,99	2899,20±203,86	2883,63±158,03 <sup>\$</sup>	2877,37±293,14	2838,38±168,97	2658,17±188,49
4	ЧСС, уд/мин	331,33±19,14	368,25±35,06	360,25±44,07	357,00±36,75	378,25±46,55	368,25±47,48	372,25±47,84
5	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	43076,40±4575,47 <sup>*</sup>	69413,55±6139,21 <sup>*\$</sup>	66393,05±7950,08 <sup>*\$</sup>	64006,11±7396,43 <sup>*\$</sup>	66089,86±8728,96 <sup>\$</sup>	62926,14±8868,91 <sup>*\$</sup>	62358,02±9444,87 <sup>\$</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\$</sup> - к исходу (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ); <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 34) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p < 0,05$ ). Различий статистически достоверных по отношению к: группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 35) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна,  $p > 0,05$ ) не выявлено.

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

**Влияние амринона в дозе 0,94 мг/кг при внутривенном введении на показатели кардио- и гемодинамики в условиях максимальной изометрической нагрузки у животных с острой интоксикацией изопротеренолом<sup>1</sup> (M±m)**

№	Показатель кардио- и гемодинамики	Исходные данные (абсолютные показатели)	Изменение показателей гемодинамики (абсолютные показатели)					
			Окклюзия, сек.					Реперфузия
			5	10	15	20	25	
1	Левожелудочковое давление, мм рт. ст.	69,50±7,85	113,95±10,70 <sup>\$</sup>	111,27±9,80 <sup>\$</sup>	108,30±9,57 <sup>\$</sup>	100,10±8,54 <sup>\$</sup>	96,60±8,74 <sup>\$</sup>	91,23±7,94 <sup>\$</sup>
2	Скорость сокращения, мм рт. ст./сек	2765,95±210,66	3454,27±186,25 <sup>\$</sup>	3440,02±254,81 <sup>\$</sup>	3185,47±206,59	3302,35±293,54 <sup>\$</sup>	3117,33±170,54 <sup>\$</sup>	2848,50±173,68
3	Скорость расслабления, мм рт. ст./сек	2625,35±112,10	2716,72±88,92	2750,15±75,35	2702,68±67,00	2700,00±71,98	2534,53±130,16	2620,10±70,95
4	ЧСС, уд/мин	280,43±18,85 <sup>*</sup>	300,25±29,53	288,28±28,46	296,65±25,80 <sup>#</sup>	317,17±16,69 <sup>\$#</sup>	308,33±31,13 <sup>#</sup>	337,27±25,42
5	ИФС, мм рт. ст. x ЧСС/г	31737,58±4470,40 <sup>*</sup>	55039,04±6795,42	51538,76±6159,49 <sup>#</sup>	51818,03±6099,74 <sup>#</sup>	51011,10±4288,00 <sup>#</sup>	47980,19±6499,34 <sup>#</sup>	48962,47±3518,00 <sup>#</sup>

Примечание: различия статистически достоверны по отношению к: <sup>\*</sup> - группе интактных животных (приложение 34); <sup>#</sup> - группе животных с острой изопротереноловой интоксикацией (приложение 35) (непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна, p<0,05); различия статистически достоверны по отношению к: <sup>&</sup> - «исходу» (непараметрический метод Фридмана с посттестом Данна, p<0,05).

<sup>1</sup> Подкожно вводили изопротеренол 80 мг/кг 2-кратно через 24 часа.

- 1 -

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ОАО  
«Всероссийский научный центр  
по безопасности биологически  
активных веществ»



докт. биол. наук, профессор  
Митрохин Н.М.

### АКТ

#### о биологических испытаниях соединения РУ - 353

##### Материалы и методы.

Испытания соединения РУ-353 проводили методом фиксации потенциала на трабекулах предсердия лягушки *Rana Ridibunda* при температуре 20-22°C. Фиксацию потенциала осуществили по 4-х электродной схеме с применением двойного сахарозного моста (Brown H.F., Clark A., Noble S.J., J. Physiol. (Lond.), 1976, 258, p. 521-545; Filippov A.K., Porotikov Y.J., Gen. Physiol. Biophys., 1983, №2, p.95-106).

Ширина тестовой щели 0,2 мм. Стимуляцию препарата по заданным программам, регистрацию ПД и ионных токов, а также вычисление параметров ПД, порога возбуждения, вольт-амперных характеристик и других параметров ионных каналов, вывод данных проводили в автоматизированном режим с помощью ЭВМ СМ-3, сопряженной с экспериментальной установкой через модули КАМАК (Поротиков В.И., Литвинов В.Г., Филиппов А.К., Гальченко А.А., Дедус Ф.Ф., Хохлов А.Н. в сб. "Материалы совещания биологической секции САНИ при президиуме АН СССР, 3-4 июня 1981. г. Пущино, 1982). Перфузию трабекул производили раствором Рингера следующего состава (мм): NaCl - 110, KCl - 2,5; CaCl<sub>2</sub> - 1,8. В качестве буфера использовали систему KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> - NaHCO<sub>3</sub>. Исследуемое вещество вводили в раствор Рингера, время действия 10-12 минут. Затем трабекулы отмывали нормальным раствором Рингера в течение 10 -12 минут.

### Результаты.

Эффект РУ-353 на медленный входящий (кальциевый  $I_{Ca}$ ), быстрый входящий (натриевый  $I_{Na}$ ) и выходящий (калиевый  $I_K$ ) токи представлены в табл. 1 и рис. 1.

Таблица. 1

**Влияние соединения РУ-353 на трансмембранные токи трабекул  
предсердия лягушек методом фиксации потенциала**

Ионные токи	Концентрация (Моль)			
	$1 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$
$I_{Na}$	+15	-30	-30	-34
$I_{Ca}$	-30	-33	-35	-34
$I_K$	-39	-45	-51	-60

Как видно из табл. 1, характерной особенностью РУ-353 является его влияние на все три тока сразу, причем с увеличением концентрации эффекты усиливаются. Уменьшение  $I_K$  в присутствии РУ-353 подобно действию хинидина, а эффективные концентрации одного порядка (для хинидина  $3 \times 10^{-6}$  М) (В.И. Поротиков, М.Д. Машковский, К.А. Зайцева "Особенности действия некоторых антиаритмических веществ на ионные токи в предсердии лягушки", ж. Фармакология и токсикология, 1979, № 2, стр. 142-147). По блокированию медленного входящего  $I_{Ca}$  РУ-353 уступает по эффективности блокаторам кальциевых каналов, но действует в достаточно низких концентрациях ( $1 \times 10^{-6}$  М). Угнетение быстрого натриевого тока также характерно для РУ-353 и этим оно пополняет вещества первой группы, а действующая концентрация гораздо меньше, чем лидокаина ( $5 \times 10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М) соответственно.

Способность РУ-353 влиять на все три  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  трансмембранных тока отличает это соединение от стальных известных антиаритмиков, которые способны влиять на один или два тока в различной комбинации.

По способности угнетать  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  РУ-353 не уступает известным антиаритмикам и даже превосходит некоторые из них; способность угнетать всю совокупность токов может быть перспективной для лечения некоторых форм аритмии и, особенно, оказания скорой помощи.

Зав. лабораторией  
возбудимых мембран  
док. биол. наук



В.И. Поротиков

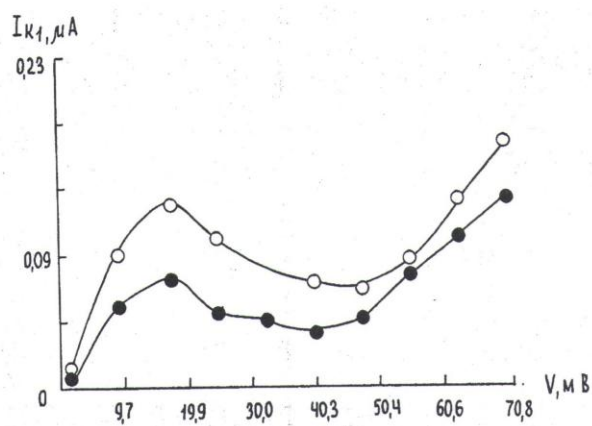


Рис.1. Вольт-амперные характеристики выходящего из клетки тока ионов калия  $I_K$ , измеренного через 150 мс после включения прямоугольного стимула варьруемой амплитуды.

Примечание: ○ - контроль, ● - РУ-353,  $1 \cdot 10^{-5}$  М, 12 мин.



УТВЕРЖДАЮ

НИИ кардиологии ТНЦ АМН СССР

АМН СССР, профессор

(Р.С.Карлов)

1988 года

## ОТЧЕТ

(промежуточный - на 1 июля 1988 г.)

о проделанной работе по договору о научном сотрудничестве на 1987-1990 гг между Ростовским ордена Трудового Красного Знамени университетом им. А.М. Сулова, Волгоградским ордена Трудового Красного Знамени медицинским институтом и НИИ кардиологии ТНЦ АМН СССР (г. Томск)

Руководитель

д.м.н.

Н.П. Дарионов

Ответственный

исполнитель

В.Б. Червяков

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Выделение кальмодулина из мозга быка проводили по методу Гопалокриши и Андерсона [1].

Препарат частично очищенной кальций - зависимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов сердца кролика получали по методу Томпсона [2].

Гомогенность полученных белковых препаратов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, используя систему Лэммли [3].

Активность фосфодиэстеразы определяли по методу Кинкайда [4].

Флуоресценцию 3,3'-дипропилтиокарбонилин Йодида ( $diS-C_3-(5')$ ) регистрировали по методу, предложенному С.Н. Орловым [5].

Коэффициент стимуляции - отношение КМ-зависимой активности фермента к базальной.

**Цель работы:** изучить влияние химических соединений производных бензимидазола на базальную и кальмодулинзависимую активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, а также оценить взаимодействие препаратов с кальмодулином и по полученным результатам предложить практическую перспективу исследования вновь выявленных биологически активных соединений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Таблица 1 содержит значения удельной активности фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ) в отсутствие и в присутствии  $2 \times 10^{-7}$  М кальмодулина (КМ-зависимая активность). Исследовано влияние различных производных бензимидазола взятых в концентрации 100 мкМ на базальную активность и на КМ-зависимую активность ФДЭ.

Для некоторых групп производных бензимидазола в таблице отмечено значение концентрации соединений ( $K_{0.5}$ ), необходимых для полумаксимального вытеснения флуоресцентного красителя ( $diS-C_3-(5')$ ) из кальций-зависимого комплекса с кальмодулином.

Как видно из таблицы 1, наиболее эффективными ингибиторами КМ-зависимой активации ФДЭ является диоксифенил-С<sub>2</sub>-производные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (РУ-185, РУ-186, РУ-187, РУ-188, РУ-190). Все препараты этой группы, не влияя на базальную активность фермента (в отсутствие кальмодулина), предотвращают активацию ФДЭ кальмодулином.

Значительные антикальмодулиновые эффекты обнаружены у пирроло[1,2-*a*]бензимидазолов, при этом не исключено выявление для них каких-либо других физиологических эффектов, связанных с участием кальмодулина в регуляции кальций-зависимых процессов. По эффективности ингибирования КМ-зависимой активности ФДЭ препараты этого ряда (РУ-541, РУ-546) близки к диоксифенил-С<sub>2</sub>-производным имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов.

К таким же сильным ингибиторам кальмодулина можно отнести препарат РУ-17 из группы N<sup>9</sup>-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, к которым также относятся РУ-284 и РУ-63. Последний по своей ингибирующей способности близок к РУ-17. В противоположность РУ-17 и РУ-63 основным эффектом соединения РУ-284 является влияние на базальную активность ФДЭ. Высокая антикальмодулиновая активность подтверждена низким значением  $K_{0.5}$  для соединения РУ-17.



Существует ряд производным бензимидазола со средним или слабым антикальмодулиновым эффектом, которые снижают коэффициент стимуляции ФДЭ до 3,6-5,4 против 8,0 в контроле. К ним относятся  $C_2$ -бензимидазольные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы,  $N_1$ -замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, диметоксифенил- $C_2$ -производные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолы вообще не обладают ингибирующим действием на КМ-зависимую активацию ФДЭ.

Производные тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов вытесняют флуоресцентный зонд  $diS-C_3-(5')$  из кальцийзависимого комплекса с кальмодулином при добавлении РУ-552 и РУ-556 (значение  $K_{0,5}$  составляют 4,5 и 45 мкМ, соответственно).

По значения  $K_{0,5}$ , полученным для имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов можно также выделить РУ-607, РУ-597 и предполагать у них антикальмодулиновую активность.

Необходимо отметить, что большинство имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов обладает ингибирующими эффектами на базальную активность ФДЭ, причем в отдельных случаях наблюдается полное ингибирование базальной активности фермента, такое сильное действие оказывает препарат РУ-451. Препараты РУ-502, РУ-503, РУ-457, РУ-597 также сильно влияют на базальную активность ФДЭ. Добавление кальмодулина при этом вызывает повышение активности ФДЭ лишь до базального уровня.

Среди пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолов также обнаружены препараты с сильным эффектом на базальную активность ФДЭ, из них можно выделить РУС-66, РУС-38, РУС-97, РУС-98. Не исключено поэтому неспецифическое влияние имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолов на другие изоформы фосфодиэстеразы, а, следовательно, и на обмен циклических нуклеотидов в целом, что может проявиться в каких-либо физиологических эффектах.

Оставшиеся препараты, представленные производными тиазоло(3,2-*a*)бензимидазола, и группа соединений ряда бензимидазола не имеют каких-либо выраженных эффектов ни на базальную активность ФДЭ, ни на КМ-зависимую активность фермента и в этом плане не представляет интереса.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования выявлен ряд новых ингибиторов кальмодулина, у которых следует ожидать  $K_i$  в микромолярном эквивалентном интервале, что сравнимо с известными ингибиторами кальмодулина - производными фенотиазина. К выявленным ингибиторам кальмодулина можно отнести препараты РУ-17, РУ-63. Эти препараты могут проявить физиологические эффекты, действуя на уровне кальций-кальмодулинзависимых процессов.

Ряд препаратов с сильными эффектами на базальную активность ФДЭ может, оказывать эффекты на уровне катаболизма циклических нуклеотидов. Эти препараты представлены имидазо[1,2-*a*]бензимидазолами (РУ-502, РУ-503, РУ-451, РУ-457, РУ-597) и пиразоло[1,5-*a*]бензимидазолами (РУС-66, РУС-38, РУС-97, РУС-98) и также являются интересными для физиологических исследований.

Таблица 1

## Влияние производных бензимидазола на фосфодиэстеразы цАМФ

	Препарат 100мкМ	K <sub>0,5</sub> мкМ	Коэф-нт Стимул ФДЭ	Удельн. активность ФДЭ, нМ АМФ/мгб×мин	
				Базальная (A±S <sub>A</sub> )	КМ-завис. (A±S <sub>A</sub> )
1	Контроль		5,95	0,28±0,03	1,69±0,07
2,9-дизамещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
2	РУ-530	18	5,24	0,26±0,04	1,34±0,02
3	РУ-470	130	6,89	0,20±0,05	1,39±0,05
Тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы					
4	РУ-552	40	7,78	0,19±0,05	1,52±0,24
5	РУ-553	300	9,69	0,17±0,05	1,66±0,06
6	РУ-555	1000	6,12	0,26±0,01	1,60±0,07
7	РУ-556	45	5,82	0,23±0,01	1,31±0,13
Диоксифенил-С <sub>2</sub> -производные имидазо[1,2-а]бензимидазола					
8	РУ-185		1,86	0,28±0,04	0,52±0,03
9	РУ-186		3,90	0,25±0,01	0,96±0,05
10	РУ-187		2,68	0,17±0,02	0,46±0,07
11	РУ-188		2,19	0,21±0,01	0,47±0,09
12	РУ-190		1,87	0,27±0,01	0,50±0,02
1	Контроль		8,0	0,21±0,05	1,68±0,07
N <sub>0</sub> -замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
2	РУ-284		12,6	0,07±0,03	0,89
3	РУ-17	7	1,8	0,21±0,03	0,39±0,02
4	РУ-63		2,1	0,21±0,02	0,44±0,02
N <sub>1</sub> -замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
5	РУ-354		5,4	0,14±0,03	0,76±0,04
Пирроло[1,2-а]бензимидазолы					
6	РУ-541		3,3	0,23±0,01	0,74±0,01
7	РУ-546		3,6	0,21±0,03	0,74±0,05
Диметоксифенил-С <sub>2</sub> -производные имидазо[1,2-а]бензимидазола					
8	РУ-181		4,5	0,20±0,03	0,92±0,05
9	РУ-254		8,8	0,20±0,01	1,75±0,04
Имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
10	РУ-331	250	4,3	0,18±0,04	0,78±0,07
1	Контроль		5,7	0,35±0,03	1,99±0,03
Имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
2	РУ-570	40-50	1,98	0,14±0,01	0,29±0,04
3	РУ-571	200	15,1	0,05±0,01	0,82±0,05
4	РУ-575	100	1,9	0,23±0,02	0,46±0,04
5	РУ-576	400	4,9	0,18±0,08	0,88±0,01
6	РУ-597	80	3,8	0,10±0,04	0,38±0,02

7	РУ-598		4,1	0,29±0,04	1,19±0,06
8	РУ-607	20-25	3,3	0,26±0,01	0,87±0,01
9	РУ-608	170	9,6	0,09±0,03	0,86±0,14
10	РУ-616		5,7	0,16±0,03	0,94±0,13
11	РУ-618		2,2	0,23±0,04	0,52±0,03
12	РУ-619	140-150	5,4	0,14±0,01	0,74±0,02
13	РУ-625		6,1	0,25±0,04	1,52±0,01
1	Контроль		5,08	0,25±0,01	1,26±0,03
Имидазо[1,2-а]бензимидазолы					
2	РУ-510		3,13	0,24±0,02	0,74
3	РУ-513		2,7	0,14±0,03	0,36±0,04
4	РУ-533		4,46	0,22±0,01	0,96±0,04
5	РУ-534		6,02	0,11±0,01	0,64±0,02
6	РУ-502		3,07	0,06±0,01	0,18±0,02
7	РУ-503		5,51	0,05±0,01	0,27±0,02
8	РУ-451		27,92	0,01±0,02	0,19±0,03
9	РУ-457		2,27	0,09±0,02	0,21±0,02
10	РУ-467		5,16	0,11±0,01	0,56±0,02
1	Контроль		6,44	0,24±0,01	1,55±0,06
Тиазоло[3,2-а]бензимидазолы					
2	СУМ-45		7,79	0,17±0,05	1,32±0,01
3	СУМ-40		3,93	0,16±0,03	0,63±0,07
4	СУМ-39		7,15	0,19±0,01	1,37±0,06
5	СУМ-38		4,20	0,17±0,01	0,72±0,01
1	Контроль		6,44	0,24±0,01	1,55±0,06
Пиразоло[1,5-а]бензимидазолы					
2	РУС-46		3,60	0,14±0,01	0,50±0,04
3	РУС-66		6,48	0,07±0,01	0,46±0,02
4	РУС-38		4,64	0,10±0,02	0,48±0,01
1	Контроль		7,69	0,16±0,02	1,22±0,02
Пиразоло[1,5-а]бензимидазолы					
2	РУС-91		8,08	0,15±0,03	1,24±0,07
1	Контроль		5,03	0,45±0,05	2,28±0,11
Пиразоло[1,5-а]бензимидазолы					
2	РУС-79		6,05	0,24±0,01	1,45±0,16
3	РУС-80		1,52	0,37±0,18	0,56±0,19
Бензимидазолы					
4	РУ-604		3,35	0,43±0,07	1,42±0,02
5	РУ-535		6,78	0,31±0,01	2,07±0,01

1	Контроль		5,84	0,33±0,01	1,93±0,05
Бензимидазолы					
2	РУ-538		5,62	0,23±0,18	1,31±0,09
3	РУ-539		15,91	0,11±0,01	1,78±0,20
Пиразоло[1,5-а]бензимидазолы					
4	РУС-94		10,26	0,15±0,08	1,52±0,08
5	РУС-95		6,44	0,30±0,11	1,90±0,25
6	РУС-96		6,98	0,31±0,19	2,17±0,13
7	РУС-97		7,59	0,05±0,08	0,41±0,08
8	РУС-98		11,56	0,06±0,04	0,68
9	РУС-81		4,60	0,12±0,16	0,56±0,09
1	Контроль		9,26	0,19±0,01	1,76±0,03
Бензимидазолы					
2	РУ-458		34,5	0,02±0,01	0,69±0,03
3	РУ-687		6,40	0,15±0,01	0,96±0,01
4	РУ-713		9,47	0,15±0,01	0,42±0,05
5	РУ-687		8,35	0,17±0,02	0,42±0,05
1	Контроль		13,9	0,08±0,02	1,11±0,02
Бензимидазолы					
2	РУ-717		9,5	0,08±0,03	0,76±0,05
3	РУ-718		12,3	0,06±0,02	0,74±0,03
4	РУ-720		7,6	0,08±0,02	0,61±0,02
5	РУ-722		8,8	0,08±0,02	0,70±0,02
6	РУ-723		4,5	0,06±0,02	0,27±0,02
7	РУ-730		6,3	0,07±0,01	0,44±0,06

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gopalokrishna R., Anderson W.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 104. P.830-836.
2. Thomson W.J., Terasaki W.L., Epstein P.M. and Strada S.J. // Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1979. V. 10. P. 69.
3. Laemly U.K., Favre M. // J. Mon. Biol. 1973. V.80. P.575-599.
4. Kinkaid R.L., Manganiello V.C., Vaughan M. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 11345-11350.
5. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Рязский Г.Г., Кравцов Г.М. // Биохимия. 1984. Т. 49. С.51-59.